

**Infrarotspektroskopische Untersuchungen
an Phospholipid-Modellen
und biologischen Membranen**

Georg Papakostidis

1972

Infrarotspektroskopische Untersuchungen

an

Phospholipid-Modellen

und

biologischen Membranen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorgrades der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Georg Papakostidis

aus Athen/Griechenland

München 1972

1. Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.G.Zundel

2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.-D.Stachel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.Okt. 1972

Vervielfältigt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1968 bis April 1972 im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Privat-Dozent Dr. G. Zundel,
der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich besonders herzlich für die wertvollen Diskussionen und sein großzügiges Entgegenkommen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. E. Mehl vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München danke ich für die Isolierung der erregbaren Membranen und für die Hilfestellung bei der Herstellung der Erythrozytenmembranen.

Herrn Dr. W. Bode vom Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung danke ich für die Hilfe bei der Aufnahme der CD und ORD Spektren, Herrn Dr. Rohleder von der Gesellschaft für Strahlenforschung in München für die Durchführung der Metallionen Analyse mittels Atomabsorption. Herrn Röhrich danke ich für die rasche Beschaffung von Chemikalien und Fräulein I. Straub für das Schreiben des Manuskripts.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Inhalt

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Experimenteller Teil	2
II.1.	Phospholipide. Auswahl der Isoliermethode	2
II.1.1.	Isolierung der natürlichen Phospholipide aus Rinderhirn	2
II.1.1.1.	Abtrennung des Phosphatidylcholin (Lecithin)	7
II.1.1.2.	Auftrennung der Phosphatidyläthanolamin- Fraktion (Kephalin)	7
II.1.1.3.	Reinigung von Kephalin, Lecithin und Phospha- tidylserin	8
II.1.2.	Quantitative Kontrollen	10
II.1.2.1.	Phosphorbestimmung	10
II.1.2.2.	Elektrodialyse	11
II.1.2.3.	Gegenionenbestimmung mittels Atomabsorption	11
II.1.2.4.	Dünnschichtchromatographische Kontrolle	13
II.1.3.	Probenherstellung	13
II.1.4.	Phospholipid-Spektren	15
II.1.5.	Mizellenbildung	17
II.2.	Modellsubstanzen	20
II.2.1.	Darstellung der Modellsubstanzen	22
II.2.1.1.	Versuche mit einstufigen Reaktionen	22
II.2.1.2.	Versuche mit zweistufigen Reaktionen	24
II.2.1.3.	Versuche mit mehrstufigen Reaktionen	25
II.2.1.4.	Darstellung von Colaminphosphorsäure-P- Methylester	27
II.2.1.5.	Darstellung von Serinphosphorsäure-P-Methyl- ester	29
II.2.2.	Vorbereitung der Meßlösung	31
II.2.3.	Flüssigkeitsküvetten	35
II.3.	Isolierung von Erythrozytenmembranen aus Rinderblut	36
II.3.1.1.	Vorbereitung der Ionen-Proben	37
II.3.1.2.	Film-Herstellung aus Erythrozytenmembranen	37
II.3.1.3.	IR-Küvette und Aufnahme der Ery-Membranen	39

	Seite
II.3.2. Isolierung erregbarer Membranen aus Rattenhirn	40
II.3.2.1. Vorbereitung der Ionen-Filme erregbarer Membranen	40
II.4. IR-Spektrometer und Aufnahme der Spektren	41
III. Meßreihen an den Modellmolekülen, Zuordnung der IR-Banden und die Ursachen einer Kontinuumsabsorption	42
III.1. Zusammenstellung der ausgeführten Meßreihen	42
III.1.1. Serinphosphorsäure-P-Methylester	42
III.1.2. Colaminphosphorsäure-P-Methylester	44
III.2. Zuordnung der IR-Banden	45
III.2.1. Lösungsmittelbanden (H_2O bzw. D_2O)	45
III.2.2. Zuordnung der Banden des Serinphosphorsäure-P-Methylesters (SPM)	47
III.2.3. Zuordnung der Banden des Colaminphosphorsäure-P-Methylesters (CPM)	50
III.3. Kontinuumsabsorption: Theorie	54
III.3.1. Symmetrische Wasserstoff-Brücken und Polarisierbarkeit	54
III.3.2. Unsymmetrische Wasserstoff-Brücken und Doppelminimum	57
IV. Ergebnisse bei den Modellsubstanzen und deren Diskussion	60
IV.1. Serinphosphorsäure-P-Methylester	60
IV.1.1. Deprotonierungs- und Protonierungs-Serie	60
IV.1.2. Salze von SPM	69
IV.2. Colaminphosphorsäure-P-Methylester	76
IV.2.1. Protonierte Serie	76
IV.2.2. Salze von CPM	79
V. Diskussion der Ergebnisse an biologischen Membranen	80
V.1. Allgemeine Vorstellungen bezüglich der Membranstruktur	80

	Seite
V.2. Zuordnung der Banden der Spektren und Konformationsabhängigkeit der Amidbanden	82
V.3. Nachweis der ioneninduzierten Konformationsumwandlung bei erregbaren Membranen	88
V.4. Diskussion der Befunde an den Erythrozytenmembranen	94
V.4.1. Filme mit Na^+ - bzw. K^+ -Ionen	94
V.4.2. Filme mit Ca^{++} - bzw. Mg^{++} -Ionen	99
V.4.3. Vergleich der Alkali- mit den Erdalkali-Ionen Filmen	102
Zusammenfassung	103
Literatur	105

I. Einleitung

Eigenschaften, Struktur und Funktion biologischer Membranen sind seit langem zentrales Forschungsgebiet mehrerer naturwissenschaftlicher Disziplinen. Zum Studium der Membranbausteine und ihrer Wechselwirkungen werden in zunehmendem Maße physikalische Untersuchungsmethoden herangezogen. Ioneninflüsse und verschiedene Konformationsveränderungen sind nur unter Beibehaltung der natürlichen Struktur des Materials interessant, deshalb muß mit diesem Material besonders sorgfältig umgegangen werden. Berücksichtigt man diese Gesichtspunkte, dann stellt die IR-Spektroskopie eine der besten Methoden zur Klärung solcher Probleme dar.

Man weiß heute, daß biologische Membranen hauptsächlich aus Proteinen und Phospholipiden bestehen. Sie weisen erstaunlich gute Stabilitätseigenschaften auf. Untersuchungen mit organischen Lösungsmitteln lassen darauf schließen, daß kovalente Bindungen zwischen Lipiden und Proteinen keine Rolle spielen. Vielmehr bewirken Ionenbindungen, Wasserstoff-Brücken und insbesondere die hydrophobe Wechselwirkung die Stabilität.

Da die funktionellen Gruppen der Phospholipide für die Existenz der Ionenbindungen in den Membranen verantwortlich sind, schien mir zunächst eine Untersuchung der Ioneneinflüsse auf diese Gruppen für erforderlich.

Bei vielen Versuchen habe ich festgestellt, daß es bisweilen unmöglich ist, natürliche Phospholipide direkt mit Ionen in Wechselwirkung zu bringen. Phospholipide haben die Neigung Mizellen zu bilden, die hydrophoben Teile des Moleküls können sich sternenförmig nach außen und die hydrophilen nach innen anordnen. Will man die Gegenionen bei diesem Gebilde austauschen, so gelingt dies nicht, denn die Ionen haben keine Chance an ihr Ziel zu kommen. Damit liegen aber bei diesen Mizellen recht unnatürliche Ionenwechselwirkungsbedingungen vor.

Solche Schwierigkeiten grundsätzlicher Natur zwangen mich nach Substanzen zu suchen, die alle Eigenschaften der Phospholipide hinsichtlich ihrer Ionen-Wechselwirkung beibehalten und dennoch keine Mizellen bilden können. Deshalb suchte ich nach Modellmolekülen, die im Wasser gut löslich sind, denn in wäßrigen Lösungen können die Gegenionen an die Festionen herantreten und damit ist eine natürliche Ionen-Wechselwirkung gegeben. Als geeignet erwiesen sich Moleküle bei denen der in den natürlichen Phospholipiden vorhandene Glycerin-Fettsäurerest durch eine Methylgruppe ersetzt ist. Dadurch ist die Unlöslichkeit im Wasser und die Gefahr der Mizellenbildung beseitigt. Die Ergebnisse der Phospholipid-Messungen wurden durch Arbeiten an biologischem Material erweitert.

Direkte Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Ionen und erregbaren Membranen sind aus folgenden Gründen interessant: Die Axon-Membranen des Nervensystems können durch elektrische, mechanische, chemische und thermische Reize erregt werden. Der Erregungsablauf ist mit elektrischen Erscheinungen verbunden, die infolge der Bewegung von Ionen durch die Membran entstehen.

Kinetische Erregbarkeitsmodelle lassen mehrere Konformationszustände an den Membranen vermuten. Hierbei dürfen nicht nur Potentiale sondern auch Ioneneinflüsse eine Rolle spielen.

Langwierige Isolierungsarbeiten, großer Aufwand an Zeit und Material erfordern eine möglichst auf Antrieb funktionierende Präparationstechnik. Aus diesem Grunde wurde die von mir angewandte Methode, Ionen in Wechselwirkung mit Membranen zu bringen, zuerst bei den einfachen Erythrozyten-Membranen erprobt. Die Erfahrungen aus diesen Arbeiten kamen mir bei der Bearbeitung der erregbaren Membranen zu gute.

Erregbare Membranen wurden aus Rattenhirn isoliert und mittels Dialyse mit Ionen beladen. Nach einem verfeinerten Zentrifugationsverfahren wurden nun Filme hergestellt und bei physiologischen Bedingungen im IR gemessen.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, zu erfahren, welche funktionellen Gruppen der Phospholipide maßgebend an den Ionenwechselwirkungen in den Membranen beteiligt sind, Können die Kationen die Konformation der Membran und zwar insbesondere die des Membranproteins verändern?

II. Experimenteller Teil

II.1. Phospholipide. Auswahl der Isoliermethoden

Tierisches Hirn bietet sich als Ausgangsmaterial an, denn es ist reich an Phospholipiden und kann leicht beschafft werden. Für meine Versuche habe ich Rinderhirn gewählt. Je nachdem, ob man alle Lipide erfassen will oder nur Phospholipide, geht man nach zwei verschiedenen Arbeitsmethoden vor.

a) Man behandelt den Lipidextrakt in der Wärme mit Chloroform/Methanol (2:1). Die Fällung wird mit Aceton vorgenommen und die anschließende Reinigung und Trennung durch Säulenchromatographie bzw. Graig Verteilung bewerkstelligt.

b) Man extrahiert die Phospholipide mit Aether, Cholesterin mit Aceton und Glykolipide mit heißem Aethanol. Die einzelnen Fraktionen werden dann gesondert gereinigt und in ihre Bestandteile getrennt.

Wir haben nach der zweiten Methode gearbeitet, da uns speziell die Phospholipide interessierten.

II.1.1. Isolierung der natürlichen Phospholipide aus Rinderhirn (s. Abb. 1)

Bis zu der Reinigung, Trennung und Untersuchung der Phospholipid-Fraktionen habe ich zur Isolierung des Rohmaterials nach Debuch (1) gearbeitet: 11 kg frisches Rinderhirn wurden zermahlen und der erhaltene Brei zwecks Entwässerung mit 5 Liter trockenem Aceton vermischt. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Materials umhüllte ich die Gefäße mit schwarzem Papier. Den Sauerstoff hielt ich fern, indem ich mit einem Glasrohr in die Suspension ständig Stickstoff leitete, dadurch befand sich das Material dauernd unter einer Stickstoffatmosphäre. Nach 24 Stunden wurde das Aceton erneuert, zwei Tage später abdekandiert und die Ge-

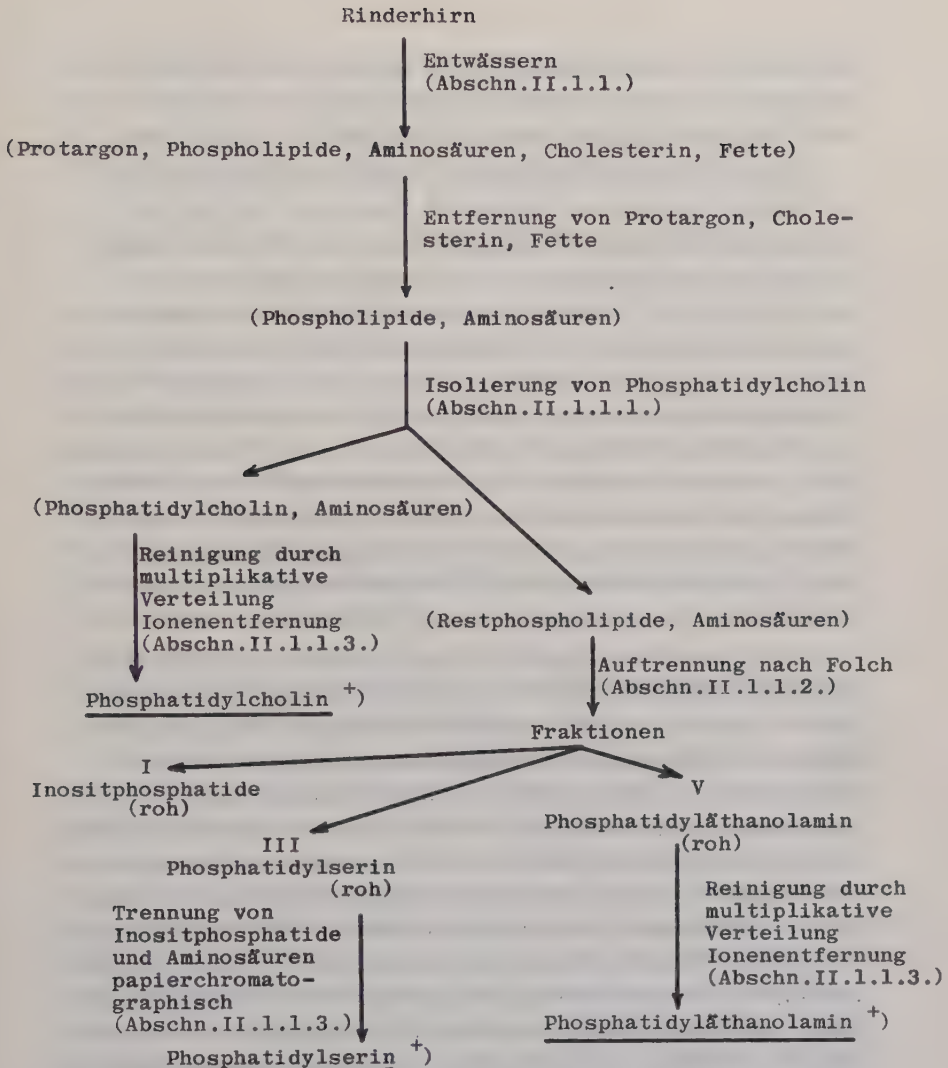


Abb. 1: Schema der Isolierung und Reinigung der Phospholipide

⁺) Phosphorbestimmung
Gegenionenkontrolle
Reinheitskontrolle (dünn-schichtchromatographisch)

hirnmasse in einen großen Soxhlet Apparat gebracht. Ich extrahierte dann 15 mal mit je 4 Liter kaltem Aceton, dazwischen wurde jedesmal Stickstoff eingeleitet.

Nach der letzten Extraktion wurde die Masse soweit wie möglich getrocknet und gleich danach 12 mal mit je 3 Liter kaltem Aether extrahiert. Den Aetherextrakt engte ich bei Zimmertemperatur auf 20 Liter ein und ließ ihn über Nacht bei 4° stehen. Das ausgefällte gelatineartige Protargon entfernte ich am nächsten Tag und engte die Lösung auf 3,5 Liter ein. Das erneut, über Nacht bei 4°, ausgeschiedene Protargon wurde wieder entfernt. Nun goß ich die Aetherlösung in 15 Liter Aceton, die Phospholipide fielen hierbei als weißgelber Niederschlag aus, in Lösung blieben Cholesterin und Neutralfette. Die Phospholipide wurden nun filtriert, mit wenig Aceton gewaschen, in 2 Liter Aether aufgelöst, bei 4° 12 Stunden lang aufbewahrt und vom letzten Protargonrest getrennt.

In dieser Reinigungsstufe untersuchte ich das Material dünnschichtchromatographisch, um einen ersten Einblick bezüglich seiner Zusammensetzung zu erhalten. Als Laufmittel wählte ich Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) (Vol %) nach Wagner (2). Es wurden zwei Dünnschichtplatten ^{†)} entsprechend hergerichtet und in die Chromatographiekammer gestellt, die Laufzeit betrug 2 Stunden. Nach dem Trocknen und Besprühen der ersten Platte mit Ninhydrin und der zweiten mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure, konnten zunächst qualitativ folgende Substanzen nachgewiesen werden. Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidyläthanolamin (Kephalin), Phosphatidylserin und Inositphosphatide. Der Beweis für die Anwesenheit gerade dieser Substanzen konnte durch Vergleich meiner R_f ^{††)}-Werte mit R_f -Werten der gleichen

^{†)} Fa. Merck AG, Darmstadt, DC-Platten Nr. 5715/0025, 250 μ

^{††)} $R_f = \frac{\text{Entfernung Start-Substanzfleck (Mitte)}}{\text{Entfernung Start-Lösungsmittelfront}}$

Substanzen aus einer Arbeit von Wagner et al. (3) erbracht werden. Die 2 Liter Aetherlösung vermischte ich nun mit 10 Liter Aceton, die dabei ausgefallenen Phospholipide wurden filtriert und feucht gewogen. Feuchtgewicht 480 g.

II.1.1.1. Abtrennung des Phosphatidylcholin (Lecithin)

Die feuchten Phospholipide wurden in 2,8 Liter Aether gelöst und mit 7 Liter absolutem Aethanol versetzt. Es fielen Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Inositolphosphatide aus. Nach der Wiederholung dieser Fällung untersuchte ich die Lecithin-Fraktion dünnschichtchromatographisch. Sie enthielt nur noch wenig Phosphatidyläthanolamin. Beide Fraktionen trocknete ich im Hochvakuum über CaCl_2 ein. Das Trockengewicht der Phosphatidyläthanolamin-Fraktion betrug 115 g das der Lecithin-Fraktion 90 g. Die Fraktionen wurden schließlich in 20 g Portionen geteilt, mit Petroläther (Sdp. 40-60°) aufgelöst und bei -30° aufbewahrt.

II.1.1.2. Auftrennung der Phosphatidyläthanolamin(kephalin)-Fraktion, nach Folch (4)

Die folgenden Arbeiten wurden in einem bei 4° temperierten Raum vorgenommen. 20 g der Phosphatidyläthanolamin-Fraktion wurden in 160 ml Chloroform gelöst und mit 182 ml absolutem Aethanol versetzt. Nach kurzer Zeit entstand eine ölige Unterphase (Fraktion I) und eine klare Oberphase. Die abdekantierte Oberphase versetzte ich mit 54 ml abs. Aethanol und bekam als untere Schicht Fraktion II. Die obere Schicht trennte ich ab und gab 400 ml abs. Aethanol dazu. Den hier erhaltenen Niederschlag (Fraktion III) filtrierte ich ab. Das Filtrat engte ich auf die Hälfte seines Volumens ein und ließ es im Kühlschrank 2 Tage lang stehen. Fraktion IV fiel dabei aus. Die überstehende klare Lösung wurde auf 20 ml eingeeengt mit 100 ml Aceton vermischt und für 24. Stunden in den Kühlschrank gestellt. Der Niederschlag

daraus war Fraktion V. Alle Fraktionen wurden im Hochvakuum getrocknet im Chloroform gelöst und bei -30° aufbewahrt.

Eine dünnenschichtchromatographische Untersuchung ergab folgendes Ergebnis:

Fraktion I	Inositphosphatide (wenig PÄ ⁺) und PS)
Fraktion II	Mischung aus Fraktion I und III
Fraktion III	Phosphatidylserin (wenig PÄ und Inosite)
Fraktion IV	Mischung aus Fraktion III und IV
Fraktion V	Phosphatidyläthanolamin (wenig PS)

II.1.1.3. Reinigung von PÄ, PC und PS

a) PÄ: Um die bei der IR-Spektroskopie erforderliche Reinheit der Substanzen zu erzielen, war es notwendig, die Folch-Fractionen weiter zu reinigen. Die Methode der Wahl ist hier die multiplikative Verteilung. Sie ist ein material-schonendes Verfahren. Das Prinzip dieser Methode ist sehr einfach, man schüttelt die Rohsubstanz mit einem Gemisch zweier miteinander beschränkt mischbarer Flüssigkeiten. Die Substanzen lassen sich auf diese Weise trennen, wenn ihre Verteilungskoeffizienten größer als 1 sind (Verteilungskoeffizient eines Stoffes ist das Verhältnis der Konzentration in der spezifisch leichteren zu derjenigen in der schwereren Phase).

Bei der multiplikativen Verteilung handelt es sich um eine mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses, also um eine Vielstufenextraktion. Arbeitsweise und Grundlagen findet man bei Hecker (5). Leider stand mir kein entsprechender Apparat nach Hecker (6) zur Verfügung, ich war daher gezwungen, die

⁺) Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin (Lecithin)
PÄ = Phosphatidyläthanolamin (Kephalin)
PS = Phosphatidylserin
MPI u. DPI= Mono- und Diphosphatidylinosit

Schütttelelemente durch Scheidetrichter zu ersetzen, die ich mit der Hand schüttelte. Beispiele für Lösungsmittel entnahm ich aus ähnlichen Arbeiten der Literatur. Ich konnte, wie Debuch in (1) mit einem Gemisch aus 2 Teilen Petroläther (60-80°) und einen Teil 99% Methanol ein sehr reines PÄ gewinnen.

b) PC: Die PC Fraktion wurde entsprechend gereinigt (7). Gleichzeitig suchte ich nach anderen Methoden, da die Arbeitsweise bei der multiplikativen Verteilung ohne maschinelle Hilfe sehr lange Zeiten in Anspruch nimmt.

Einen guten Reinheitsgrad konnte man mit der Säulenchromatographie erzielen. Erste Versuche dazu führten Hanahan et al. (8) mit Aluminiumoxyd gefüllten Säulen durch, allerdings mit mäßigem Erfolg. Lea et al. (9) sowie Rhodes und Lea (10) trennten mittels Kieselgelchromatographie die Phosphatide des Eigelbs in die Komponenten mit Chloroform/Methanol als Lösungsmittel. Phillips (11) berichtete über die Trennung der Phospholipide aus menschlichem Blutplasma.

Nelson (12) trennte auf Kieselgelsäulen, die aus kleinen Serumproben gewonnenen Phosphatide.

Das Verfahren wurde inzwischen verfeinert, man aktiviert das Kieselgel durch Erhitzen und achtet auf eine vorgeschriebene Qualität. Durch Variationen des Lösungsmittelsystems kann man die Reinheit der einen oder anderen Komponente erhöhen. Wir haben das Kieselgel BYK-Mallinekrodt [†]) 100 mesh verwendet und mit einem Chloroform/Methanol Gemisch gearbeitet, bei 70% Chloroform und 30% Methanol kam das Lecithin.

c) PS: Die Reinigung der Phosphatidylserin Fraktion bereitete mir erhebliche Schwierigkeiten. Es war mir bekannt, daß es sich hier um ein Gemisch aus PS, MPI, DPI und PÄ handelte, trotzdem konnte ich dünn-schichtchromatographisch nur PS + MPI + DPI und PÄ trennen. MPI und DPI blieben trotz aller Bemühungen mit PS vermischt. Auf der Suche nach einer

[†]) Fa. Serva Heidelberg

Trennmethode fand ich die Arbeit von Richter (13), darin wird von einem papierchromatographischen Trennverfahren berichtet. Man verwendet hierbei Formaldehyd imprägniertes Papier und Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) als Lösungsmittel. Die Herstellung dieses Papiers ist bei Hoerhammer (14) beschrieben. Diese Methode ist zur Auftrennung von inosithaltigen Phosphatiden und Phosphatidylserin gut geeignet. Ich konnte auf diesem Weg das Phosphatidylserin von seinen Begleitsubstanzen trennen. Alle Substanzen wurden in wasserfreiem Chloroform bei -30° unter Stickstoff aufbewahrt.

II.1.2. Quantitative Kontrollen

Es mußte die Konzentration der Chloroformlösungen bestimmt werden, da die gereinigten Phospholipide mit stöchiometrischen Mengen der betreffenden Gegenionen umgesetzt werden sollten. Aus diesem Grund wurde der Phosphor bestimmt. Außerdem mußte bestimmt werden, welche Ionen nach der Isolierung anwesend sind, da an den Phosphatiden in der Natur Gegenionen anwesend sind, die durch sämtliche Reinigungsstufen mitgezogen werden. Die Substanzen wurden zum Schluß elektrodialysiert. Hierbei werden die Phospholipide in die Zwitterionen übergeführt.

II.1.2.1. Phosphorbestimmung

Sie beruht auf einem papierchromatographischen Verfahren. Es ist bei Frank (15) beschrieben. Auf Formaldehydpapier nach (14), werden die verschiedenen Phospholipidproben aufgetragen (etwa 1000 γ pro Probe). Das Fließmittel bestand aus Tetrahydrofuran, Diisobutylketon, Wasser und Eisessig (45:5:6:0,5 Vol.%). Die Laufzeit betrug 3 Stunden. Das Papier wurde anschließend 30 Minuten lang bei 120° getrocknet, mit Phosphorreagenz besprüht und erneut 10 Minuten bei 80° getrocknet (Phosphorreagenz: 5ml 70% Perchlorsäure, 10 ml 1n HCl, 25 ml 4% Ammoniummolybdatlösung, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt). Nach dem Trocknen zeigen sich

die Phospholipide auf dem Papier als blaue Flecken. Die Flecken wurden nummeriert, dann ausgeschnitten, die Papierstücke ausgewogen und in Reagenzgläser gebracht. Die Gläser wurden zunächst mit 0,5 ml 70% Perchlorsäure versetzt und 2 Stunden auf 180° erhitzt (Veraschen), dann mit 5 ml einer Mischung aus 8 Teile 5% Perchlorsäure, 1 Teil 2,5% Ammoniummolybdat und 1 Teil 10% Ascorbinsäure vermischt, schließlich wurde 15 Minuten lang auf dem Wasserbad erhitzt. Die Extinktion der blauen Lösungen wurden im Kolorimeter gemessen. Die Extinktionen wurden mit der Extinktion der Lösung, die, aufgeschlossenes Papier und eine bekannte Phosphormenge enthielt, verglichen, und so die absoluten Mengen an Phosphor bestimmt.

II.1.2.2. Elektrodialyse

Besonders definierte Bedingungen bezüglich der Anwesenheit der metallischen Kationen lassen sich bewerkstelligen, wenn man von den Phospholipid-Zwitterionen ausgeht. Um die Substanzen in die Zwitterionen umzuwandeln, elektrodialysierte ich sie gegen bidestilliertes, CO_2^- freies Wasser in einer Apparatur der Fa. Sartorius ^{†)}. Hierbei verwendete ich Spezialfilter mit einem mittleren Porendurchmesser 5 μ derselben Firma. Um das PÄ besser zu suspendieren wurde in den Probenraum des Gerätes etwas Äthanol zugegeben. Die Dialyse wurde beendet, wenn mehrere Stunden ein konstanter Strom floß, der dem des reinen Wassers entsprach ($< 0,4$ mAmp. bei 150 V). Diese Zwitterionen wurden nun auf Anwesenheit metallischer Kationen untersucht.

II.1.2.3. Gegenionenbestimmung mittels Atomabsorption

Naßveraschung nach Sansoni (16): Ein Teil der elektrodialysierten Substanz wurde in einem Quarzglas mit wenig konzentrierter p.a. Schwefelsäure aufgenommen und tropfen-

^{†)} Fa. Sartorius Membranfilter GmbH Göttingen

weise mit 50% H_2O_2 versetzt. Beim Erwärmen färbt sich die Lösung schwarz (Zersetzung der Substanz), sie entfärbte sich nach H_2O_2 Zugabe. Nun wurde wieder leicht erwärmt. Die Lösung wird dabei wieder schwarz. Nach dem Abkühlen gibt man wieder bis zur Farblosigkeit H_2O_2 hinzu. Das wurde so lange wiederholt, bis die Lösung beim Erwärmen farblos blieb.

Da die Proben von der H_2O_2 - H_2SO_4 Veraschung her mehr Sulfat enthielten als durch Lanthan-Zusatz kompensiert werden konnte, wurde zunächst das Sulfat als BaSO_4 gefällt und abfiltriert. Die Filtrate wurden eingeeengt und mit Lanthan und HCl versetzt, so daß sie zum Schluß 1% Lanthan und 4% HCl enthielten. In diesen Lösungen wurden Na, K, Mg und Ca durch Atomabsorption bestimmt. Alle Blindwerte für Ionengehalte aus Reagenzien und Glasgefäße wurden parallel erfaßt und von den Endwerten abgezogen. Für die Nettogehalten ergaben sich folgende Werte (bezogen auf eingesetzte Substanz):

Substanz	Einwaage mg	Element	mg	Gehalt Gew.% entsprechend
Lecithin	200	Na	0,033 ± 0,007	0,017 ± 0,004
		K	0,027 ± 0,007	0,014 ± 0,004
		Mg	0,004 ± 0,0014	0,002 ± 0,001
		Ca	0,015 ± 0,014	0,01 ± 0,01
Kephalin	100	Na	0,004 ± 0,007	0,004 ± 0,007
		K	(-0,009) ± 0,007	(-0,01) ± 0,01
		Mg	0,011 ± 0,0014	0,011 ± 0,002
		Ca	0,07 ± 0,014	0,07 ± 0,02

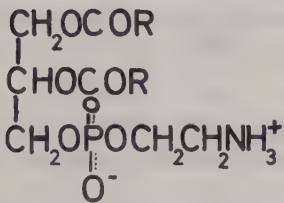
Diese Ionenmengen sind so klein, daß sie die späteren Untersuchungen nicht stören.

II.1.2.4. Dünnschichtchromatographische Kontrolle

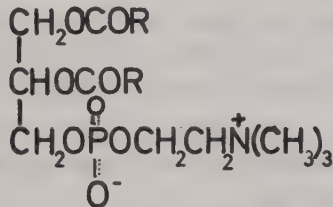
Nun prüfte ich die Substanzen noch dünn-schichtchromatographisch, wie im Abschnitt II.1.1. beschrieben. Wir konnten hierdurch feststellen, daß die Substanzen alle Reinigungsstufen ohne nennenswerte Zersetzungserscheinungen überstanden haben.

II.1.3. Probenherstellung

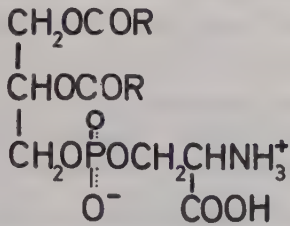
Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten ging es mir darum, bestimmte Gegenionen (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) an die funktionellen Gruppen der Phospholipide zu bringen



Phosphatidyläthanolamin



Phosphatidylcholin



Phosphatidylserin

R = Fettsäurereste, Länge und Grad der Sättigung sind je nach Herkunft verschieden.

Leider war mir in diesem Stadium der Arbeiten nicht klar, daß es keinen Sinn hatte, in dieser Richtung weiter zu arbeiten; denn wie bereits in der Einleitung erwähnt, behinderte die Mizellenbildung den Austausch und die Wechselwirkung mit den Gegenionen. Die reinen Phospholipide stellen eben sehr unnatürliche Systeme dar, denn in der Natur sind die Phospholipide ja stets mit den Proteinen verknüpft, wodurch die Bedingungen für die Gegenionen radikal verändert werden. (Näheres s. Abschnitt II.1.5.). Von den vielen Versuchen, die ich durchgeführt habe, werden daher an dieser Stelle nur einige kurz beschrieben.

a) Ich habe das nicht elektrodialysierte PC in Aethanol gelöst mit wenig Wasser vermischt und langsam zuerst durch einen Kationen (Na^+) und dann durch einen Anionenaustauscher (Cl^-) geschickt. Hiernach sollte ein definiertes Gegenionenpaar am PC anwesend sein.

b) In Aethanol gelöstes Calciumchlorid wurde mit einer stöchiometrischen Menge Zwitterionen von PC vermischt und geschüttelt.

c) Trockenes HCl-Gas wurde direkt in Aethanol eingeleitet und stöchiometrische Menge davon mit PC gemischt. Daraus erhoffte ich die protonierte Form des PC zu erhalten.

d) Misch- und Schüttelversuche mit Aether/Wasser/Chloroform Gemische sowie Versuche mit Ionenaustauschern wurden zur Herstellung der PA und PS Salze unternommen.

e) Eine direkte Neutralisation des Phosphatidylserins mit Natronlauge in einem Wasser/Aether/Chloroform Gemisch blieb ohne befriedigendes Ergebnis. Die Gemische der verschiedenen Salze wurden auf geeignete Probenträger (s. Abschnitt II.2.3.) gebracht. Die Probenträger brachte ich in einen Exsiccator, durch den ständig ein trockener Stickstoffstrom strömte. Die leichtflüchtigen Lösungsmittel wurden dadurch langsam entfernt, die entstandenen Filme im Hochvakuum getrocknet und in die IR-Küvette gebracht (s. Abschnitt II.2.3.). Die Spektren nahm ich mit einem

IR-Spektrometer Modell 221 der Fa. Perkin-Elmer im Bereich zwischen 4000 und 650 cm^{-1} auf (näheres bezüglich der Aufnahme der Spektren s. Abschnitt II.4.).

II.1.4. Phospholipid-Spektren

Es wurden die Spektren von PC, PÄ und PS aufgenommen und zwar in der Salz-, Zwitterion- bzw. protonierten Form, die man nach den erwähnten Vorbehandlungen zu erwarten hätte.

Hier werden nur als Beispiele die Spektren der Zwitterionen von PC, PÄ und PS in Abb. 2 gezeigt. In Tab. 1 ist die Zuordnung der Banden dieser Spektren angegeben. Diese Zuordnung wurde den Arbeiten (17) (18) (65) - (70) entnommen.

PS	PÄ	PC	Zuordnung	
			H H	
3010	3010	3010	-C=C-	Valenz
2955	2955	2955	-CH ₃	asym.Valenz s
2915	2915	2915	-CH ₂ -	asym.Valenz s
2845	2845	2845	-CH ₂ -	sym.Valenz s
1730	1740	1740	C=O	Valenz (Ester) s
1705	-	-	C=O	Valenz (Karbonsäuregruppe) s
1610	-	-	-CO ₂ ⁻	asym.Valenz s
1515	1535	-	-NH ₃ ⁺	asym.Deformation m
1465	1465	1465	-CH ₂ -	asym.Deformation m
1455	1455	1455	-CH ₃	asym.Deformation m
1415	-	-	-CH ₂ -	sym.Deformation m
1365	1365	1365	-CH ₃	sym.Deformation m
1245	1235	1255	>PO ₂ ⁻	asym.Valenz s
1105	1095	1095	C-O-(P)	asym.Valenz m
1065	1070	1067	>PO ₂ ⁻	sym.Valenz s

Tabelle 1: Bandenzuordnung der Phospholipide Dimension in cm^{-1})

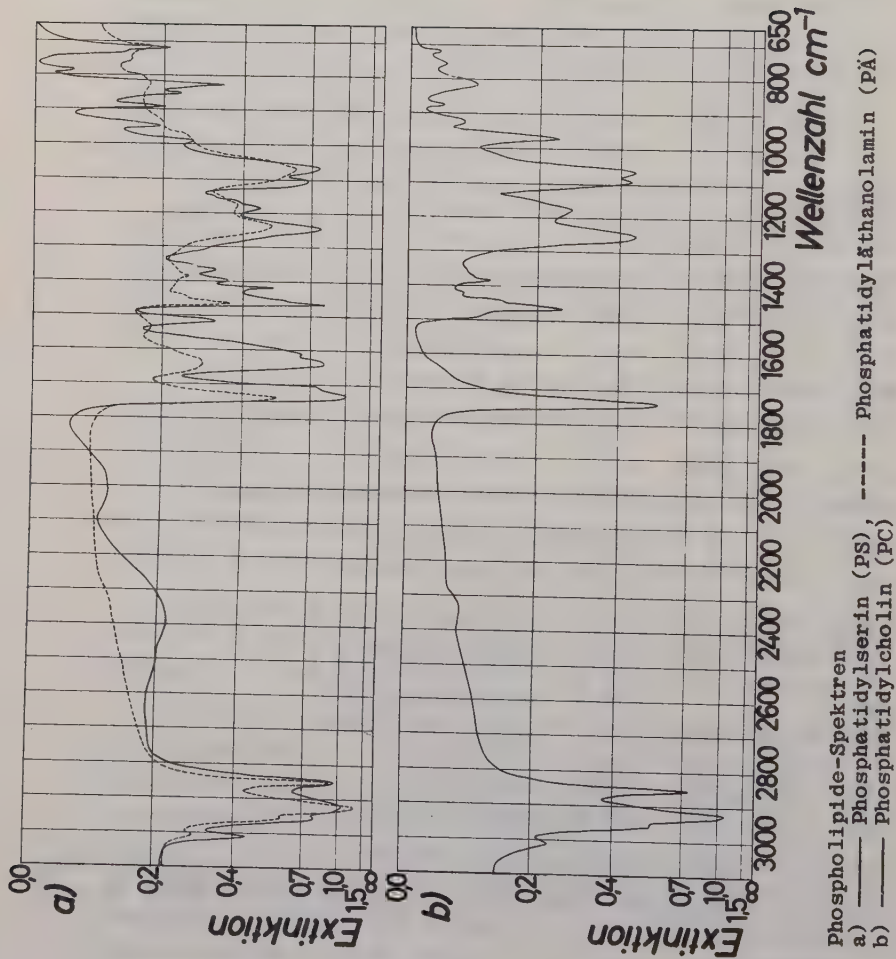


Abb. 2: Phospholipide-Spektren

Erwartete ionenabhängige Veränderungen in den Spektren:

Ich habe vor allem ionenabhängige Veränderungen an den Phosphat- und Karboxyl-Banden erwartet. Solche Veränderungen konnten in meinen Spektren jedoch nur beim PC gefunden werden. Beim PÄ und PS lagen die Verschiebungen der Banden innerhalb der Fehlergrenzen von 2 bis 3 Wellenzahlen. Insbesondere zeigte es sich, daß man saure Karboxylatgruppen des PS nicht einmal neutralisieren konnte. Das Nichtauftreten der Verschiebungen beruhte hiernach darauf, daß die Kationen nicht ausgetauscht wurden, was Atomabsorptionsuntersuchungen bestätigten.

II.1.5. Mizellenbildung

Wir sahen uns darauf die Literatur an, ob es denkbar ist, daß sich die Mizellen in der Weise ausbilden, daß die Fettsäurereste den Gegenionen den Zutritt zu den funktionellen Gruppen verwehren. Im folgenden wird kurz hierüber berichtet: Das Phänomen der Mizellenbildung wird nicht nur bei Arbeiten mit Phospholipiden beobachtet, sondern auch bei Fetten, Seifen und sonstigen Molekülen mit längeren Paraffinketten. Man konnte als Ergebnis der Röntgenuntersuchungen an Lipid-Wasser Systemen feststellen, daß Lipidmoleküle unter dem Einfluß von Parametern, die oft im Bereich physiologischer Bedingungen liegen, sich zu einer Vielfalt von Strukturen zusammenlagern können. Man erwärmt die Substanz und nimmt bei verschiedenen Temperaturen die Röntgenspektren auf. Zwischen der kristallinen Struktur und der völligen Schmelze werden mehrere Phasen beobachtet. Das Experiment kann mit und ohne Lösungsmittel durchgeführt werden.

Folgende Strukturen wurden bei der Abwesenheit von Lösungsmittel beobachtet:

Lamellar: Die Moleküle sind wie es Abb. 3 zeigt, angeordnet.

Hexagonal I: Die Struktur (Abb. 4) wird aus Stäbchen gebildet.

In den Stäbchen kehren sich die funktionellen Gruppen der Phospholipide einander zu und werden von den ungeordneten Paraffinketten umgeben. Die Stäbchen liegen in einer zweidimensional hexagonalen Anordnung vor.

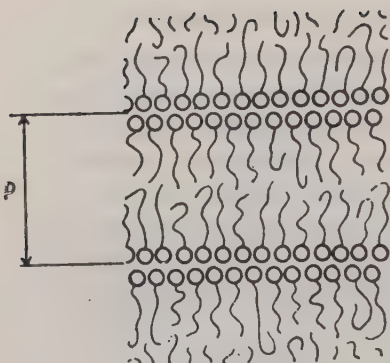


Abb. 3: Lamellar

Mizellenstrukturen ohne Lösungsmittel

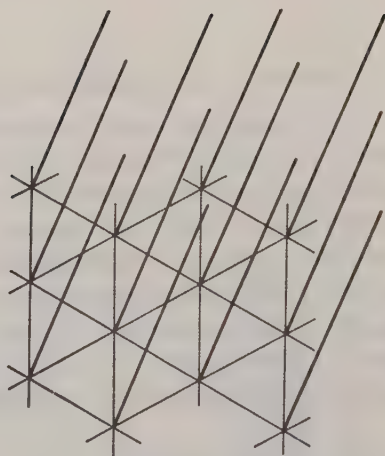


Abb. 4: Hexagonal I

Man konnte weiterhin eine orthorombische Phase (Skoulios 19), eine raumzentriert tetragonal sowie eine rhomboedrische (Luzzati et al. 20) und eine raumzentriert kubische (Luzzati und Spegt 21) finden.

Untersuchungen von Fettsäuresalzen mit zweiwertigen Ionen (Spegt und Skoulios 22 - 24) und mit einwertigen Ionen (Skoulios und Luzzati 25) ergaben, daß je nach der Natur des Kations eine bestimmte Struktur bevorzugt wird.

Bei einwertigen Ionen ist die Struktur lamellar, wobei die Lamellen als unendlich ebene Blätter, unendlich lange Bänder oder endlich große Scheiben auftreten können.

Bei zweiwertigen Ionen ist meistens die stäbchenartige Struktur vorhanden. Die Stäbchen sind kristallographisch gleich und entweder unendlich lang (eindimensionales Netz) oder endlich lang und verzweigt (zweidimensional) oder dreidimensional. Die hohe Ordnung aller dieser Phasen wird trotz der Unordnung der Paraffinketten erreicht. Die Struktur der Phasen wird also durch die Ionen an den polaren Gruppen bestimmt.

Bei der Anwesenheit von Wasser zeigen die Paraffinphasen im Prinzip die gleichen Strukturen.

Lamellar: Ihre Zusammensetzung ist die gleiche, einziger Unterschied: zwischen den Lamellen gibt es Wasserschichten (Abb.5).

Hexagonal I: Abb. 6. Diese Phase bildet eine zweidimensionale Stäbchenordnung Husson (26). Die Stäbchen bilden kreisrunde Zylinder mit den polaren Gruppen nach außen und den Paraffinketten nach innen gerichtet. Der Raum zwischen den Zylindern ist mit Wasser gefüllt. Lipid-Wasser Phasenübergänge von natürlichen Lecithinen wurden von Luzzati et al. (27) untersucht. Die häufigste wasserhaltige Phase ist die lamellare. Die hexagonale Phase wird im Lysolecithin bei 37° und im Kephalin bei 55° beobachtet.

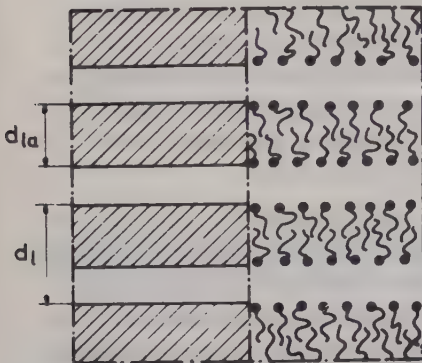


Abb. 5 Lamellar

Mizellenstrukturen mit Wasser als Lösungsmittel

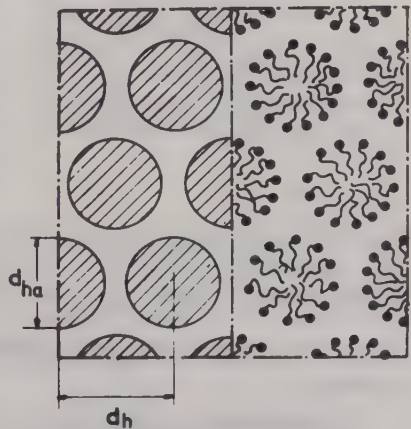


Abb. 6: Hexagonal I

Diese Versuche sind an gewöhnlichen Fettsäuren und deren Salzen durchgeführt. Entsprechende Versuche mit Phospholipiden bereiten jedoch große Schwierigkeiten.

Ein Aetherextrakt aus dem menschlichen Gehirn, der 52% Kephalin, 35% Lecithin und 13% Inositphosphatide enthielt, wurde von Luzzati und Husson (28) röntgenographisch untersucht. Das Phasendiagramm wurde als Funktion der Temperatur und der Konzentration aufgenommen. Bei Konzentrationen unter 0,8 Mol und Temperaturen bis 40° existiert nur die lamellare Phase. Konzentrationen bis 1 Mol und Temperaturen bis 40° bilden entweder eine undefinierte Struktur, sogenanntes Coagel, oder den Hexagonal II Typ Abb. 7.

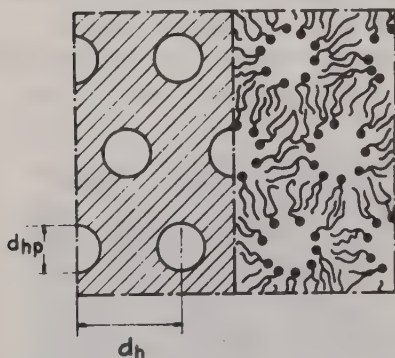


Abb. 7: Mizellenstruktur mit Aether/Wasser als Lösungsmittel: Hexagonal II

Bei den von mir durchgeführten Experimenten scheint genau dieser Hexagonal II Typ vorzuliegen, zumal ich kurz vor der Filmbildung ziemlich hohe Konzentrationen hatte. Die Mizellen bestehen aus Lipidmolekülen mit einem Kern aus polaren Gruppen in der Mitte und die Paraffinketten nach außen gerichtet.

Diese Struktur muß bei der Anwesenheit hydrophober Lösungsmittel existieren, denn gerade in dieser Umgebung sind die Paraffinketten gut löslich, während die polaren Gruppen verdrängt werden.

Andererseits war ich bei der Durchführung meiner Experimente auf hydrophobe Lösungsmittel direkt angewiesen, um überhaupt die Substanzen in Lösung zu haben. Zwangsweise mußte ich also die hexagonal II Struktur bekommen, die den Austausch der Gegenionen an den polaren Gruppen verhinderte. Daher ging ich im folgenden etwas anders vor.

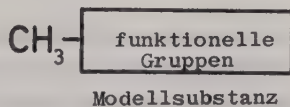
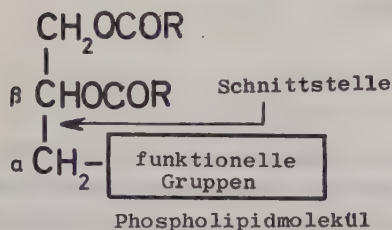
II.2. Modellsubstanzen

Die Neigung der Phospholipide Mizellen zu bilden und die dadurch verursachten Schwierigkeiten zeigten mir, daß die Bedingungen für die Ionenwechselwirkung in allen Protein freien

Phospholipidsystemen recht unnatürlich sind. Dies alles veranlaßte mich, meine Arbeitsweise radikal zu ändern.

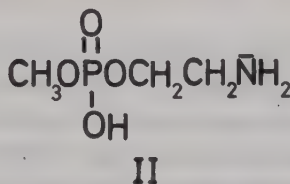
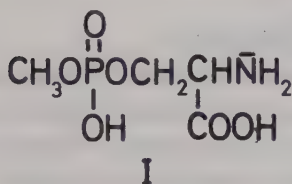
Hierzu sind folgende Ueberlegungen maßgebend gewesen: Alle Effekte und Bandenverschiebungen durch Ioneneinfluß in den Spektren müssen auch bei solchen Substanzen sichtbar sein, die keine Paraffinketten enthalten, jedoch ansonsten die selben funktionellen Gruppen besitzen. Solche Substanzen sollten im Wasser sehr gut löslich sein, und würden in allen wäßrigen Lösungen den Ionen den Zutritt zu ihren funktionellen Gruppen gestatten, da sie ja keine Neigung haben, Mizellen zu bilden.

Ich habe deshalb solche Modellsubstanzen dargestellt, die alle funktionellen Gruppen der Phospholipide, bis auf den Glycerinfettsäurerest, enthielten.



Speziell wurden die Modellsubstanzen von Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin dargestellt.

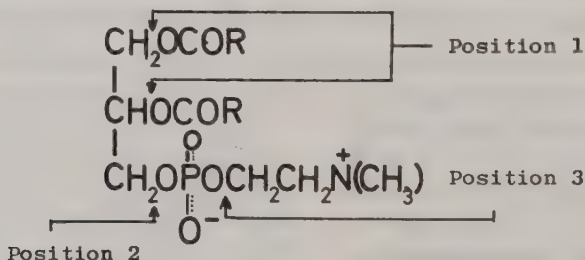
Dies sind der Serinphosphorsäure-P-Methylester (I) und der Colaminphosphorsäure-P-Methylester (II)



Man könnte sich nun denken, daß diese Modellmoleküle aus den natürlichen Phospholipiden durch Spaltung zwischen den α und β Kohlenstoffatom sich herstellen lassen. Wohl gibt es in der Natur Enzyme, die Teile aus einem Phospholipidmolekül abspalten können. So z. B. die Phospholipase A: Sie kann aus

dem Lecithinmolekül je nach ihrer Herkunft eine Fettsäure abspalten und zwar an der Stelle 1 (a) oder 2 (b) (29) - (40), Position 1.

Die Phospholipase C kann das Phosphorylcholin abspalten (41) - (45), Position 2. Phospholipase D spaltet nur das Cholin ab (46) - (47), Position 3.



Ähnliche Spaltungen gibt es auch bei den anderen Phospholipidmolekülen. Unsere Spaltung wäre jedoch mit einer Hydrierung verbunden und so etwas gibt es in der Natur an dieser Stelle und bei diesen Molekülen nicht.

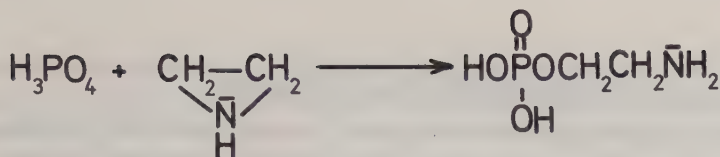
Deshalb konnte ich unsere Modellsubstanzen nicht direkt aus den natürlichen Phospholipiden herstellen sondern war gezwungen, eine Synthese durchzuführen.

II.2.1. Darstellung der Modellsubstanzen

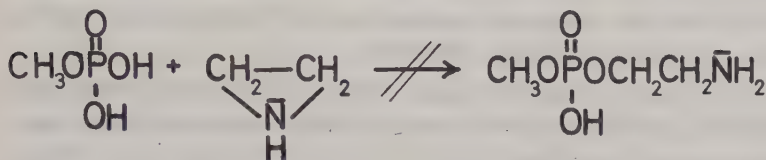
II.2.1.1. Versuche mit einstufigen Reaktionen

Ich habe in der Literatur Verfahren zur Darstellung entsprechender Substanzen gesucht und zunächst solche Arbeiten berücksichtigt, die ohne großen Aufwand ein möglichst reines Produkt liefern.

Nach Christensen (48) kann man mit einer einstufigen Reaktion unser Molekül bis auf eine Methylgruppe aus Phosphorsäure und Äthylenimin darstellen.

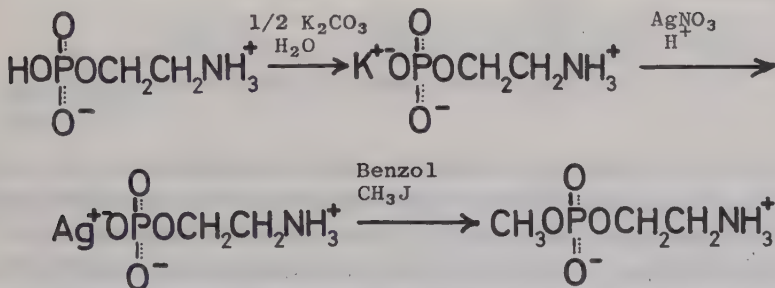


Ich ersetzte die Phosphorsäure durch den Phosphorsäuremonomethylester in der Hoffnung, meine erste Modells substanz würde sich nach dem gleichen Mechanismus aufbauen lassen.



Das Reaktionsprodukt entsprach meinen Erwartungen nicht, es handelte sich um ein Gemisch aus mehreren Substanzen.

Ein weiterer Versuch mit Colaminphosphorsäure und Methyljodid über das Kalium- und Silbersalz des Phosphors den Colaminphosphorsäuremethylester zu synthetisieren, blieb auch ohne Erfolg.



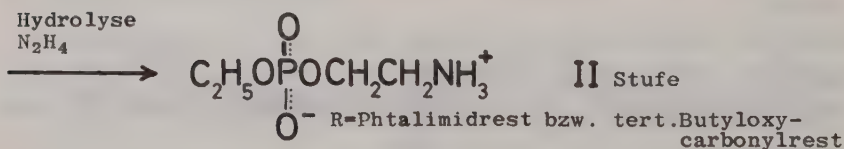
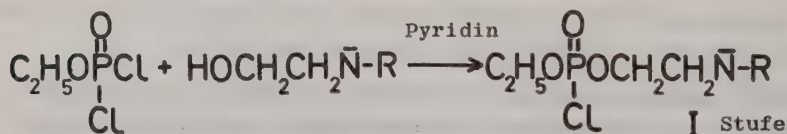
Alle Experimente mit den einstufigen Reaktionen scheiterten an den Schwierigkeiten der Trennung der Bestandteile des Reaktionsproduktes.

II.2.1.2. Versuche mit zweistufigen Reaktionen

Die Entstehung eines Gemisches, das aus mehreren Substanzen ähnlicher Konstitution bestand, versuchte ich mit der Einführung einer Schutzgruppe an die Aminogruppe des Colamins zu blockieren.

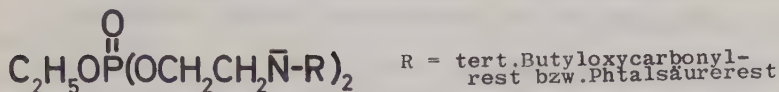
Damit wäre bei der ersten Stufe der Reaktion die Bildung von unerwünschten Ammoniumsalzen verhindert und in der zweiten Stufe hätten wir, nach der Abspaltung und Trennung der Schutzgruppe, ein reines Produkt erhalten.

Wir gingen von β -Hydroxyäthyl-Phthalimid und Aethylphosphorsäuredichlorid aus. In dem Imid ist die Aminogruppe durch den Phthalsäurerest geschützt.



Für den Fall einer mißglückten Isolierung des Produkts bzw. vorzeitigen Abspaltung des Phthalsäurerestes startete ich gleichzeitig eine zweite Reaktion mit dem tert. Butyloxycarbonylrest als Schutzgruppe. Als Partner des Aethylphosphorsäuredichlorids benutzte ich hier das tert. Butyloxycarbonyl- β -thanolamin. Beide Reaktionen sind bis auf die Schutzgruppe des Amins völlig gleich. Die entstehende Salzsäure in der ersten Stufe wird entweder direkt vom Lösungsmittel Pyridin oder, mit Benzol als Lösungsmittel, von einer zugesetzten Base abgefangen. Diese Verfahren wurden mit kleinen Variationen zur Darstellung analoger Substanzen angewandt.

Aus beiden Reaktionen isolierte ich an Stelle des Produkts der ersten Stufe eine Substanz, die statt einer zwei Schutzgruppen enthielt.



Das NMR Spektrum und die Elementaranalyse bestätigten diesen Sachverhalt. Alle Versuche mit geänderten stöchiometrischen Mengen der Ausgangssubstanzen und verschiedenen Reaktionsbedingungen lieferten entweder ein disubstituiertes Phosphormolekül oder ein gemischtes Produkt aus di- und monosubstituierten Phosphor.

II.2.1.3. Versuche mit mehrstufigen Reaktionen

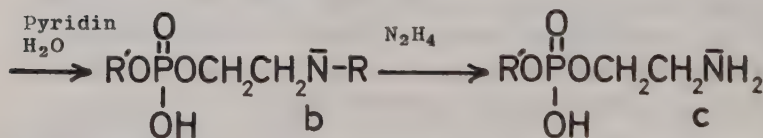
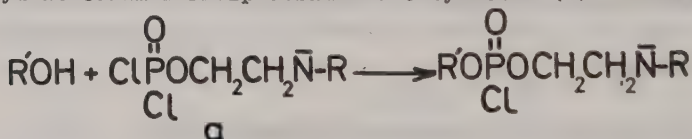
Aus der Literatur sind verschiedene mehrstufige Synthesen bekannt, die zu ähnlichen Produkten führen. Um einzelne Syntheseschritte für die Herstellung meiner Substanz zu übernehmen, arbeitete ich zunächst diese Synthesen nach.

a) Nach Hunter et al. (49) wird der Glycerindiester (alkoholische Ausgangssubstanz) mit Phosphoroxychlorid versetzt und das Reaktionsprodukt direkt mit β -Hydroxyäthylphtalimid umgesetzt.

b) Baer (50) geht zwar auch von dem Glycerindiester aus, setzt ihn aber mit Phenylphosphorsäuredichlorid um und schützt die Aminogruppe als Carbobenzoxyamid. Die Kepheline werden nach der Verseifung der Säurechloridgruppe bei Hunter bzw. Weghydrierung des Benzols bei Baer und Abspaltung der Schutzgruppen erhalten. Bei der Nacharbeitung dieser Synthesen wurden gewichtige Nachteile festgestellt, sie sind mit schlechten Ausbeuten verbunden und führen zu stark verunreinigten Produkten.

c) Hirt und Berchtold (51) entwickelten ein besseres Verfahren, das alle Nachteile der bisherigen Synthesen beseitigt. Die Bildung von unerwünschten Aminoalkoholsalzen wird durch Einführung der vorgebildeten Phosphorsäure-Amino-Äthanol-Estergruppe in dem betreffenden Alkohol vermieden.

Als neues Zwischenprodukt wird Phtalimidoäthyl-Phosphorsäuredichlorid, das leicht aus Hydroxyäthylphtalimid und Phosphoroxychlorid erhalten werden kann, verwendet. Das Phtalimidoäthyl-Phosphorsäuredichlorid (a) wird mit dem Cetylalkohol zur Cetyl-Phtalimidoäthyl-Phosphorsäure (b) umgesetzt, die ihrerseits nach der Verseifung des Phosphorchlorids mit Hydrazinhydrat Colamin-Phosphorsäure-P-Cetylesther (c) liefert.



R' = Cetylrest, R = Phtalsäurerest

Ich habe nach dieser Methode, wie Hirt und Berchtold, mit sehr guter Ausbeute obige Substanz hergestellt und versuchte parallel hierzu den Colamin-phosphor-P-säure-Methylester zu synthetisieren.

Bei der Synthese wurde lediglich der Cetyl durch den Methylalkohol ersetzt. Die ausgezeichneten Ergebnisse mit dem Cetylalkohol wurden mit dem Methylalkohol leider nicht erhalten. Chemisch ändert sich mit dem Methylalkohol als Reaktionspartner nichts, man kommt glatt bis zur Stufe des Endprodukts. Die Kristallisationseigenschaften der Substanz werden jedoch stark verändert. Die lange Kohlenwasserstoffkette des Cetylalkohols ist beim Methylalkohol nicht vorhanden, dadurch fällt in der letzten Stufe der Synthese der Colamin-Phosphor-säure-

Methylester im Gegensatz zum Cetylester nicht aus, er bleibt in der Lösung und kann von den Begleitsubstanzen nicht getrennt werden.

d) Dieselbe Schwierigkeit, wie bei der Methode von Hirt-Berchtold, trat auch bei dem für die Synthese von Phospholipiden sehr guten Verfahren von Barzilay-Lapidot ein (52), der Darstellung des Phosphatidyl-äthanolamins aus dem Pyridiniumsalz der Phosphatidylsäure und dem tert. Butyloxycarbonyläthanolamin. Während der Nacharbeit der Literaturverfahren stellte ich fest, daß es wohl sehr gute Methoden zur Darstellung von Phospholipiden mit langen Kohlenwasserstoffketten gibt, die den natürlichen Phospholipiden bis auf die ungesättigten Bindungen in den Fettsäuren ähnlich sind. Unter diesen Umständen entschloß ich mich, Reaktionsstufen aus verschiedenen Methoden zu einer Gesamtsynthese zusammenzufügen. Mit dieser Kombination hatte ich Erfolg.

II.2.1.4. Darstellung von Colaminphosphorsäure-P-Methylester

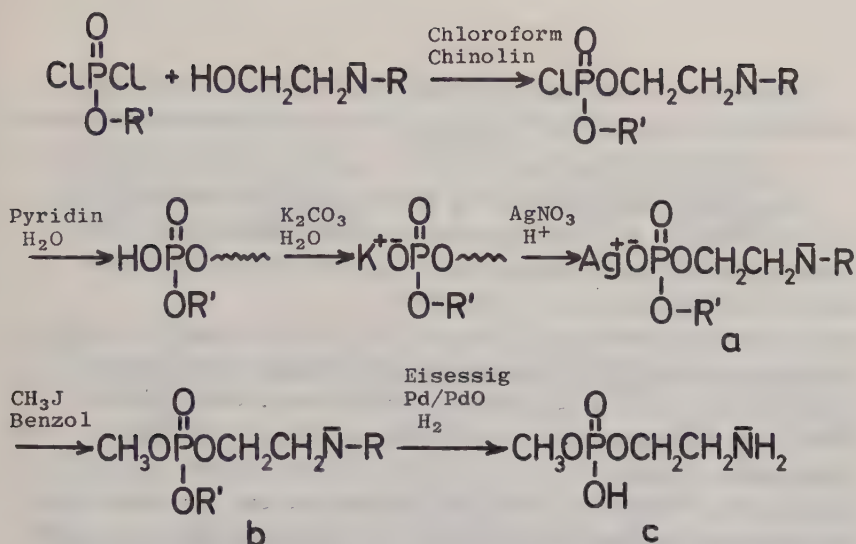
Die besten Ergebnisse bei der Modifizierung der Literaturarbeiten für unsere Zwecke hatte ich mit der Methode von Baylis et al. (53).

Zunächst stellte ich die Substanz (a), den Phosphorsäure-(2-carbobenzyloxyaminoäthylester)phenylester (Silbersalz) her: Zu einer Mischung von 54,7 g Phosphorsäurephenylesterdichlorid, 35 g trockenem Chinolin und 50 ml trockenem Chloroform wurde eine Lösung von 50,4 g 2-Carbobenzyloxyaminoäthanol in 300 ml Chloroform innerhalb 8 Stunden bei 0° hinzugefügt. Die Mischung ließ ich über Nacht bei Raumtemperatur stehen und entfernte am nächsten Tag das Chloroform unter vermindertem Druck bei 35°. Zum Rückstand wurden unter Rühren und Kühlen 20 g Pyridin und 10 ml Wasser tropfenweise hinzugefügt und nach 24 Stunden bei Raumtemperatur weitere 150 ml Wasser und 57,2 g Kaliumcarbonat zugegeben. Die wäßrige Lösung wurde 3 mal mit 200 ml Aether extrahiert, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde erschöpfend mit Äthanol extrahiert. Nach Eindampfen der vereinigten äthanolischen Extrakte verblieben 54 g des Kalium-

salzes in Form eines viskosen Oels. Dieses wurde in 50 ml Wasser aufgenommen mit Salpetersäure leicht angesäuert und mit 28 g Silbernitrat in 28 ml Wasser gelöst und vermischt. Ueber Nacht fiel das Silbersalz aus, es wurde abfiltriert mit Wasser und Aethanol gewaschen und mehrere Tage im Vakuum über konz. Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute: 49 g.

Hieraus stellte ich die Substanz (b), den Phosphorsäure-(2-carbobenzyloxyaminoäthylester)phenylester-methylester her; 3 mMol des obigen Silbersalzes wurden mit 2,5 mMol Methyljodid in 50 ml trockenem Benzol unter Rühren im Dunkeln 3 Stunden im Rückfluß gekocht, nach dem Abkühlen und Filtrieren wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rest im Aether aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Als Rückstand blieb ein leicht gelbliches, viskoses Oel.

Hieraus stellte ich die Substanz (c), den gewünschten Colaminphosphorsäure-Methylester her: 2 mMol (0,732g) der vorliegenden Verbindung wurden in 30 ml Eisessig in Gegenwart von 1 g Palladiumschwarz und 1 g Palladiumoxyd unter Normaldruck bis zur beendeten Wasserstoff-Aufnahme hydriert. Der überschüssige Wasserstoff wurde entfernt, der Katalysator abfiltriert, die Essigsäure destilliert und der Rückstand im warmen Methanol aufgenommen. Baylis (53) nahm sein Rohprodukt mit Aether auf und reinigte es durch Umkristallisieren aus Aethanol. Ich habe einen anderen Weg gewählt, denn meine Substanz enthielt keine Kohlenwasserstoffketten und war somit Aether unlöslich. Zunächst versuchte ich die Begleitsubstanzen des Gemisches nach Baer (54) zu entfernen. Die methanolische Lösung wurde mit Wasser vermischt, leicht angesäuert und durch einen Kationenaustauscher (H^+ -Form) geschickt. Das Hauptprodukt blieb als Kation in der Säule hängen, während die nicht hydrierte Anteile mit Methanol, weil elektroneutral, herausgespült wurden. Mit einer wäßrigen Salzlösung wurde dann die Substanz aus der Säule eluiert.



R = Benzyloxycarbonylrest

R' = Phenylrest

Das Ergebnis der Elementaranalyse war dennoch nicht befriedigend. Wahrscheinlich enthielt das Gemisch zusätzlich überhydrierte Anteile, die in der Säule mit zurückgehalten wurden und das Endprodukt verunreinigten.

Zur Lösung des Problems arbeitete ich wie folgt: Die das Rohprodukt enthaltende methanolische Lösung wurde auf Chromatographie Platten, 2 mm Schichtdicke, aufgetragen und die Flächen mit den Flecken der Fremdstoffen nach der Entwicklung des Chromatogramms entfernt.

Die reine Substanz wurde aus den Platten mit Methanol extrahiert und drei mal aus Methanol umkristallisiert, sie stellt ein weißes Pulver dar. Schmp. 199°.

II.2.1.5. Darstellung von Serinphosphorsäure-P-Methylester

Hier kombinierte ich die Methode von Baer (54), zur Darstellung der ersten Ausgangssubstanz mit der Methode von Bevan et al. (55) und meinem Reinigungsverfahren zu einer gemeinsamen Synthese.

Zunächst stellte ich die Substanz (a) her, es ist der N-Benzylloxycarbonyl-DL-Serinbenzylester β -(Silberphenylphosphat).

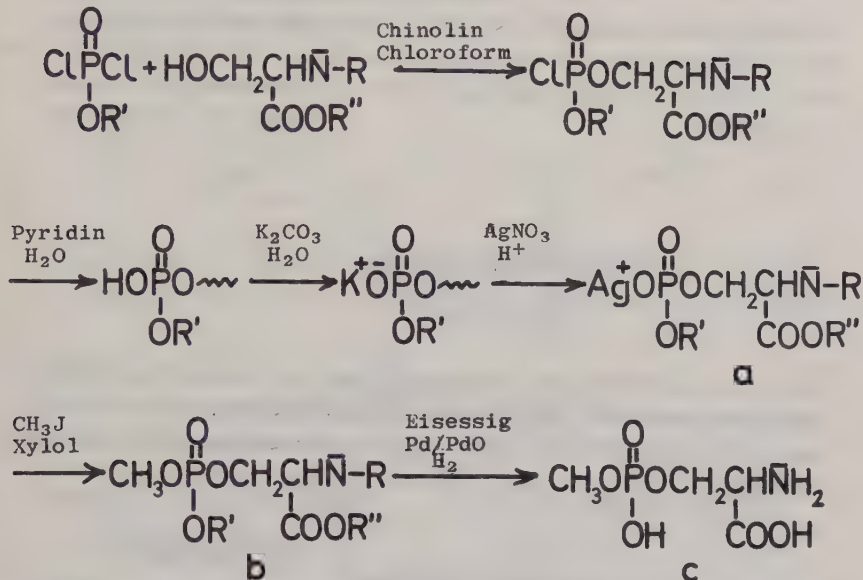
Zu einem Gemisch von 4,3 g Phenylphosphorsäuredichlorid und 2,6 Chinolin in 15 ml trockenem Chloroform wurden 6,6 g N-Benzylloxycarbonyl-DL-Serinbenzylester in 40 ml trockenem Chloroform langsam bei 0° zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Rühren bei 0° und 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden 2 ml Pyridin und 1 ml Wasser hinzugefügt und nochmals 1/2 Stunden gerührt. Das Solvens wurde dann im Vakuum bei 35° abgezogen und der Rückstand in 15 ml Wasser aufgenommen. Zugabe von 4,2 g Kaliumcarbonat fällte das Kaliumsalz des Phosphats, nach der Extraktion der Suspension mit Aether wurde das Salz abfiltriert. 1,2 g des Kaliumsalzes wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 0,5 g Silbernitrat vermischt. Es schied sich ein zähes Produkt ab, es wurde mit Wasser verrieben und über P₂O₅ getrocknet.

Hieraus stellte ich die Substanz (b) her, es ist der N-Benzylloxycarbonyl-DL-Serinbenzylester β -(Methylphenylphosphat).

1,5 mMol des Silbersalzes wurden in 15 ml trockenem Xylol gelöst mit 1,2 mMol Methyljodid versetzt, im Dunkeln unter Feuchtigkeitsschuß 15 Minuten im Rückfluß gekocht, danach das entstandene Silberjodid entfernt und das Filtrat im Vakuum zum Trocknen eingengt. Der Rückstand wurde in Aether gelöst und je zweimal mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Die ätherische Lösung wurde getrocknet und anschließend der Aether entfernt. Als Rest blieb ein zähflüssiges Oel.

Aus diesem wurde die gewünschte Substanz (c) der Serinphosphorsäure-Methylester hergestellt. 1,5 mMol der obigen Substanz wurden in 50 ml Eisessig gelöst, mit 2 g Palladiumschwarz/Palladiumoxyd (1:1) vermischt und bei Normaldruck bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme hydriert. Der überschüssige Wasserstoff und der Katalysator wurden entfernt und das Filtrat im Vakuum zum Trocknen eingengt. Der Rückstand wurde im Methanol aufgenommen und genau wie im vorigen Kapitel beschrieben gereinigt.

Weißes Pulver, Zersetzung bei 135°.



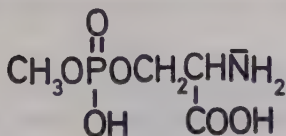
R = Benzyloxycarbonylrest, R' = Phenylrest,
R'' = Benzylrest

II.2.2. Vorbereitung der Meßlösungen

Die hergestellten Substanzen wurden auf ihre Eigenschaften hin untersucht, ihre Struktur war so geplant, daß sie in reinem Zustand eine große Löslichkeit im Wasser aufweisen sollten. Ich konnte nun mit der Herstellung der Meßlösungen beginnen.

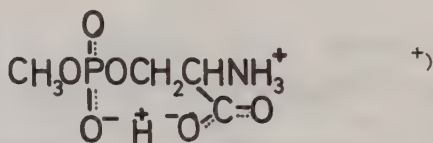
a) Meßlösungen des Serinphosphorsäure-Methylesters

Anhand der vorhandenen funktionellen Gruppen hatte ich bei dieser Substanz folgende Kombinationsmöglichkeiten:

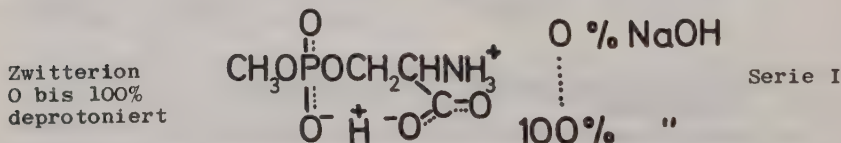


Ausgangskonfiguration

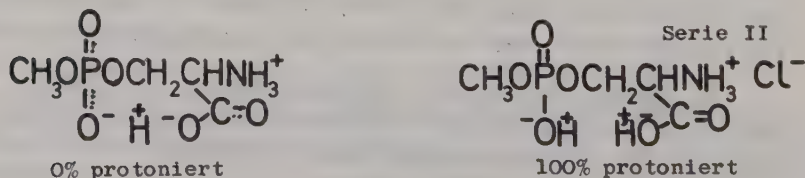
Diese Ausgangskonfiguration geht wegen der großen Acidität der Phosphatgruppe in das Zwitterion über. (s. Abschnitt III.3.). Das Proton der Carboxylgruppe hält sich zwischen den sauren Gruppen auf.



Ich habe das Proton der Carboxylgruppe mit Natronlauge stufenweise neutralisiert und so eine Deprotonierungsreihe von 0% bis 100% durchgeführt, wobei 100% Deprotonierung das Natrium-Salz ist.

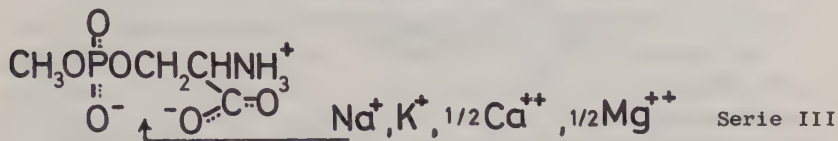


Eine zweite Protonierungsreihe entstand, als ich das Zwitterion zusätzlich mit Salzsäure bis auf 100% protonierte.

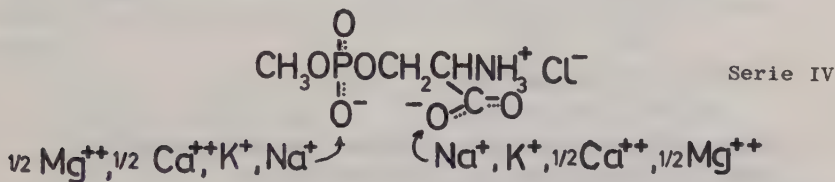


⁺) Genaue Lage des Protons und Bindungsverhältnis in den Anionen
s. Seite 60

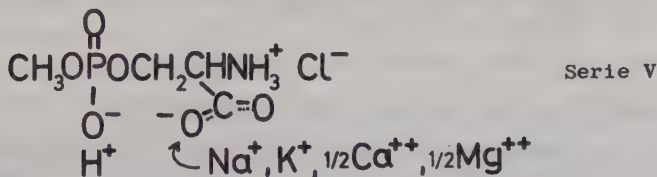
Die Neutralisation des Zwitterions, bzw. der Austausch des Protons im Kationenaustauscher, ergab die Salzserie:



Durch Zugabe stöchiometrischer Mengen von NaCl, KCl, CaCl₂ und MgCl₂ Lösungen zu der Serie III entstanden die bi-Salze.

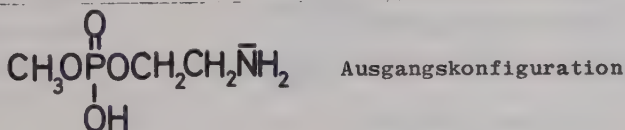


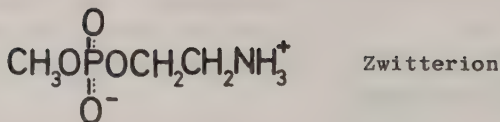
Die Protonierung der Serie III ergab schließlich die kombinierten Salz-Proton-Formen:



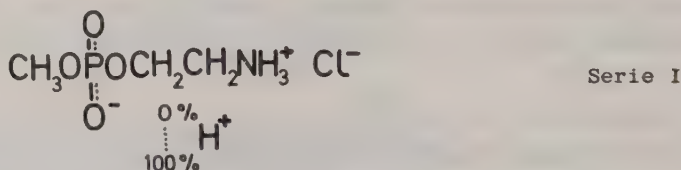
b) Meßlösungen des Colaminphosphorsäure-Methylesters

Durch die Abwesenheit der Carboxylgruppe wird die Zahl der möglichen Kombinationen verringert.

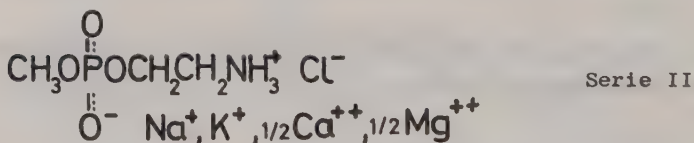




Die stufenweise Protonierung mit Salzsäure ergab folgende Serie:



Die Salze entstanden durch Mischen des Zwitterions mit stöchiometrischen Mengen der Salzlösungen



Herstellung der deuterierten Lösungen.

Die deuterierten Lösungen wurden analog vorbereitet. Dazu wurden zunächst die H₂O-Lösungen hergestellt, im Exsiccator über P₂O₅ getrocknet, dann mit D₂O versetzt und wieder getrocknet. Diesen Vorgang wiederholte ich drei mal. Die deuterierten Substanzen wurden schließlich in je 50 µl D₂O aufgenommen und gemessen.

II.2.3. Flüssigkeitsküvetten

Zur Messung der Salz-Lösungen und der deuterierten Substanzen wurde eine Küvette mit variabler Schichtdicke, nach Kampschulte-Scheuing (56), verwendet. Die Einstellung der Schichtdicke war bis auf $\pm 0,3 \mu$ möglich, sie wurde während der Messung auf 25° thermostatisiert. Als Fenster verwendete ich polykristallines Germanium.

Die Eichung der Schichtdicke wurde an Hand der integralen Extinktion der Benzolbanden bei 1959 und 1815 cm^{-1} vorgenommen. Die im Hinblick auf die unterschiedliche Dichte erforderliche Schichtdickenkorrektur berechnete ich nach folgender Formel:

$$\delta = \delta' \cdot \frac{\rho'}{M'} \cdot \frac{M}{\rho}$$

δ = gesuchte Schichtdicke
 δ' = standard Schichtdicke
 M = Molekulargewicht der untersuchenden Substanz
 M' = Molekulargewicht der Standardsubstanz

ρ = Dichte von M , ρ' = Dichte von M'

Zur Messung der protonierten Serien wurde eine Küvette mit konstanter Schichtdicke nach Hofmann (57) benutzt. Eine 37 mm breite und 5 mm dicke Germanium Scheibe wurde längs der breiten Seite so geschliffen, daß in ihrer Mitte ein etwa 1 cm breiter und im Schnitt 13μ tiefer Schliff entstand. Eine zweite gleichgroße Germaniumplatte wurde auf die erste gelegt Abb. 8.

- A = Ge-Platten
- B = Schliff
- C = Eisenvorrichtung
- D = Stahlfedern
- E = Schrauben
- F = Gummiring

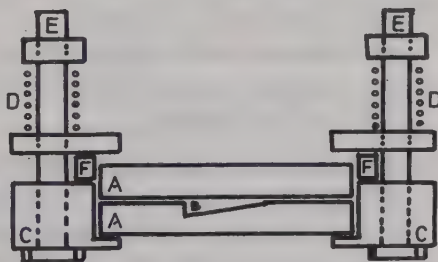


Abb. 8: Schnittzeichnung der Meßküvette mit konstanter Schichtdicke

Mittels einer Vorrichtung aus 2 Eisenplatten und 4 mit Stahlfedern bestückten Schrauben, konnte auf die Germanium-Platten ein reproduzierbarer Druck ausgeübt werden. Das war die Voraussetzung für eine reproduzierbare Schichtdicke. Die Küvette konnte thermostatisiert werden. Als Vergleichsküvette dienten 2 Germanium-Scheiben der gleichen Dicke.

II.3. Isolierung von Erythrozytenmembranen aus Rinderblut

Das Prinzip der Isolierung beruht auf einer Arbeit von Burger et al. (58), lediglich die Pufferlösungen und die Zentrifugierbedingungen wurden von mir geändert.

a) Isolierung und Waschen der Blutkörperchen

9 Teile Rinderblut (direkt beim Schlachten entnommen) wurden mit 1 Teil Na-Citrat Lösung (3,8%) vermischt, bei 4° 30 Minuten zentrifugiert (1000 g) und von der überstehenden Flüssigkeit getrennt. Die Zellen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) aufgenommen (Volumenverhältnis 1:6) und bei 4° 30 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Den letzten Vorgang wiederholte ich 3 mal.

b) Osmotischer Schock

Nach dem Waschen goß ich die roten Blutkörperchen in einen Na-Phosphat Puffer (NaH_2PO_4 10mMol, Na_2HPO_4 7mMol, pH 7,4) und rührte die Suspension bei 4° 10 Minuten lang (Volumenverhältnis 1:10). Während des Rührens platzten die Blutzellen und die im Inneren befindliche Flüssigkeit diffundierte heraus.

Das Gemisch zentrifugierte ich 30 Minuten mit 30.000 g und trennte die Erythrozytenmembranen von der überstehenden Zellflüssigkeit.

c) Waschen der Erythrozytenmembranen

Die Ery-Membranen mischte ich mit einem Puffer (aus MgCl_2 5mMol, NaH_2PO_4 5mMol, Na_2HPO_4 3,5mMol pH 7,4) und rührte die Mischung kurz bei 4°. Anschließend wurde 30 Minuten mit 30.000 g zentrifugiert und das ganze 3 mal wiederholt.

Eine kleine Probe der gereinigten Membranen wurde mit Hilfe einer Phasenkontrastaufnahme (700-fache Vergrößerung) auf ihre Beschaffenheit untersucht und in Ordnung befunden.

II.3.1.1. Vorbereitung der Ionen-Proben

Gleiche Mengen der Membransuspension brachte ich in 5 Dialyseschläuche und dialysierte sie 30 Stunden gegen eine EDTA (1mMol)-Tris(1mMol) pH 7,4 Puffer-Lösung unter Schütteln bei 4°. Danach wurde die Puffer-Lösung gegen folgende Ionen-Lösungen getauscht:

Probe 1)	100 mMol	NaCl,	5mMol	Na-Kakodylat	pH 7,4
" 2)	100 "	KCl,	5mMol	K- Kakodylat	" "
" 3)	50 "	CaCl ₂ ,	5mMol	Ca-Kakodylat	" "
" 4)	50 "	MgCl ₂ ,	5mMol	Mg-Kakodylat	" "
" 5)	Physiologische Lösung bestehend aus NaCl 154mMol, KCl 5,6 mMol, CaCl ₂ 2,2mMol, Na ₂ HPO ₄ 2,15mMol, NaH ₂ PO ₄ 0,85mMol pH 7.				

Ich dialysierte 48 Stunden bei 4° und erneuerte die Ionen-Lösungen mehrmals. Aus diesen Suspensionen wurden die entsprechenden Ionenfilme hergestellt.

II.3.1.2. Film-Herstellung aus Erythrozytenmembranen

Bei früheren Arbeiten hat man die vorbereiteten Suspensionen auf einen geeigneten Träger gebracht und vorsichtig das Lösungsmittel mit einem Trockenmittel oder durch langsame Wegdampfen an der Luft entfernt.

Der dadurch entstandene Film wurde im Vakuum völlig getrocknet und je nach Bedarf in der IR-Küvette (Abschnitt II.3.1.3.) hydratisiert und gemessen. Meine empfindlichen biologischen Substanzen hätten eine ähnliche Prozedur sicherlich nicht unversehrt überstanden. Außerdem war die Reproduzierbarkeit der Methode sehr schlecht.

Ich stellte meine Filme nach einer neuen Methode von Hofmann (59) her, Abb. 9.

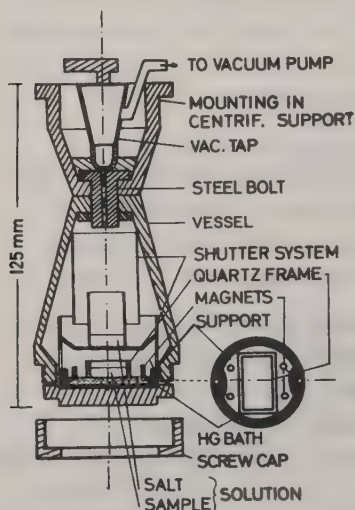


Abb. 9: Zentrifugenbe-
hälter mit Hg-Bad
aus Hofmann (59)
entnommen

Eine Germanium-Platte mit einer zylindrisch geschliffenen Vertiefung wurde auf ein Hg-Bad gelegt, das sich in einem evakuierbaren Zentrifugen-Behälter befand. Der Radius der Vertiefung entsprach dem Durchmesser des Kreises des rotierenden Zentrifugen-Rotors. Oberhalb des Hg-Bades befand sich eine konzentrierte NaBr-Lösung. Der Behälter wurde evakuiert und in die Zentrifuge gestellt. Die Erythrozyten-Suspension befand sich somit in einem luftleeren Raum bei etwa 60% Luftfeuchtigkeit und wurde mit 1500 g 10 Stunden lang zentrifugiert. Die konz. NaBr-Lösung entnahm während dieser Zeit der Suspension ihr Wasser, ohne die Probe völlig zu trocknen. Die gleichzeitig vorhandene Zentrifugalkraft sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Substanz auf dem Ge-Träger.

Das neue Verfahren wies folgende Vorteile auf. Man konnte Filme mit einer besser als auf 2% reproduzierbaren Dicke herstellen. Der Film entstand in einem geschlossenen Behälter und wurde in einer CO_2 -freien Box in die IR-Küvette gebracht, ohne mit normaler CO_2 -haltiger Luft in Berührung zu kommen. Der Film wurde nicht völlig getrocknet, was eine Erhaltung des biologischen Zustandes der Erythrozyten-Membranen garantiert.

II.3.1.3. IR-Küvette und Aufnahme der Ery-Membranen

Ich verwendete eine speziell zur Messung von Filmen und Membranen konstruierte Küvette, nach Zundel et al. (60), sie war mit 2 KRS-5 Fenstern (aus 44% TlBr und 56% TlJ) versehen und konnte thermostatisiert werden. Das angelegte Vakuum wurde mit einem Hg-Manometer kontrolliert.

Durch eine im Vergleichsstrahl befindliche und analog konstruierte Küvette wurden die Wasserdampfabsorptionen und Lichtverluste durch Reflexion an den Küvetten-Fenstern kompensiert. Die Küvette ist so konstruiert, daß man jeden erwünschten Feuchtigkeitsgrad einstellen kann.

Die Germanium-Träger wurden in der CO_2 -freien Box, aus den Zentrifugenbehältern geholt und in die IR-Küvette gestellt. In den Küvetten befand sich, in einem eigens dafür angebrachten Glaskolben, eine konzentrierte BaCl_2 -Lösung. Die Küvetten wurden mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und 24 Stunden lang bei 25° thermostatisiert. Unter diesen Bedingungen herrschte in dem Küvettenraum nach Stokes et al. (61) 90% Feuchtigkeit.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte so, wie sie im Abschnitt II.4. beschrieben wird.

II.3.2. Isolierung erregbarer Membranen aus Rattenhirn

Wir präparierten aus dem Gehirn von 5 - 8 Wochen alten Ratten eine Fraktion, in der nicht myelinisierte Axon-Membranen angereichert waren nach dem in (62) angegebenen Verfahren. Die in dieser Arbeit mit P₂B bezeichnete Fraktion wurde so weit verdünnt, daß sie 0,6 molar an Sacharose war. Darauf wurden von dieser Fraktion 20 ml auf einen Dichtegradienten gegeben, der aus 10 ml 0,8 molarer und aus 30 ml 1,0 molarer Sacharose bestand. Dieser wurde 5h in dem SW 25,2 Rotor in der präparativen Ultrazentrifuge Spinco Modell L bei 22 500 Umdrehungen zentrifugiert. Die Axonmembranfraktion wanderte an die Grenzfläche zwischen der 0,8 und 1,0 molaren Sacharose-Lösung. Die erhaltene Axon-Fraktion wurde auf eine Konzentration von 0,32 molar Sacharose verdünnt und 75 Minuten bei 105 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde osmotisch geschockt, dies durch homogenisieren mit dem 20 fachen Volumen destillierten Wassers. Daraufhin wurde nochmals sedimentiert. Ausgehend von 30 g frischen Gehirns enthielten die 1,5 ml Endsuspension gereinigter Axon-Membranen 8,7 mg Protein, die nach der Lowry Methode (63) bestimmt wurden. Die spezifische Aktivität der Acetylcholinesterase wurde nach Ellman (64) zu 14,9 μ Mole/min/mg gemessen.

II.3.2.1. Vorbereitung der Ionen-Filme erregbarer Membranen

Aliquote Teile des hergestellten Membrankonzentrats brachte ich in 5 Dialyseschläuche und behandelte sie wie folgt:

Probe 1 wurde 4 Stunden lang mit neutralisiertem Wasser unter völligem Ausschluß von CO₂ dialysiert. Ich verwendete nichtgepuffertes bidestilliertes Wasser, das mit ein wenig Lauge auf pH 7 eingestellt wurde, um die Anwesenheit des Puffers zu vermeiden. Dieses neutralisierte Wasser enthielt 100 mikromolar Na⁺ Ionen. Aus dieser Probe gewann ich den Film.

Probe 2 wurde zunächst wie Probe 1 behandelt und dann weitere 4 Stunden gegen eine 200 nanomolare Tetrodotoxin-Lösung dialysiert. Daraus wurde ein Film gewonnen, der zusätzlich zu den Ionen der Probe 1 Tetrodotoxin enthielt.

Probe 3 schüttelte ich 30 Stunden in einer 1mMol EDTA, 1mMol tris-HCl pH 7,4 Lösung, danach 20 Stunden lang in einem aus 100mMol NaCl und 5mMol Na-Kakodylat pH 7,4 bestehenden Puffer. Um die bei der Filmeherstellung auftretende Konzentrierung der Lösung und den damit verbundenen Ionenüberschuß zu vermeiden, dialysierte ich diese Probe 4 Stunden gegen neutralisiertes Wasser und stellte daraus den Na^+ -Film her.

Probe 4 Kalium- und Probe 5 Calciumfilm wurden analog wie der Na-Film aus Kalium- und Calciumsalz-Lösungen hergestellt. Die Filme wurden nach dem gleichen Verfahren von Hofmann (59), wie im Abschnitt II.3.1.2. beschrieben, gewonnen und mit derselben IR-Küvette gemessen. Die Einstellung des IR-Spektrographen ist im Abschnitt II.4. angegeben.

II.4. IR-Spektrometer und Aufnahme der Spektren

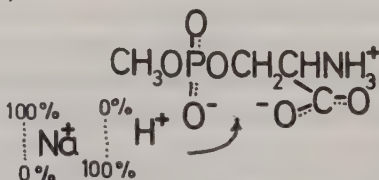
Die Spektren wurden mit einem IR-Gerät der Firma Perkin-Elmer Modell 325 aufgenommen. Der Meßraum wurde mit einem Spülgerät Wasserdampf und CO_2 frei gehalten. Ich habe in dem Bereich zwischen 4000 und 600 cm^{-1} mit folgender Geräte-Einstellung gemessen: Spaltprogramm 6,5, Verstärkung 2,5, Zeitkonstante 2. Die Empfindlichkeit des Geräts wurde bei der Messung laufend überprüft.

III. Meßreihen an den Modellmolekülen, Zuordnung der IR-Banden und die Ursachen einer Kontinuumsabsorption

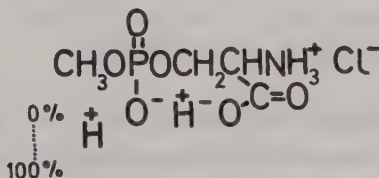
III.1. Zusammenstellung der ausgeführten Meßreihen

III.1.1. Serinphosphorsäure-P-Methylester

0 bis 100% Deprotonierungsreihe (Deprotonierung mit NaOH in H₂O)
(Abb. 17a, Seite 62)



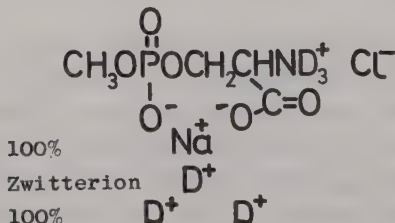
0 bis 100% Protonierungsreihe in H₂O



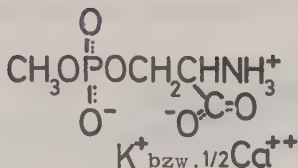
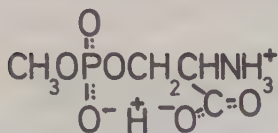
100% Deprotonierung

Zwitterion in D₂O (Abb. 17b, Seite 62)

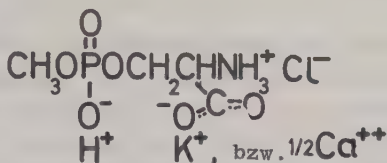
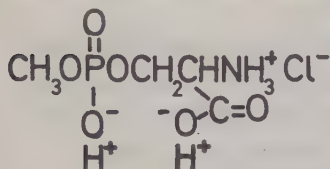
100% Protonierung



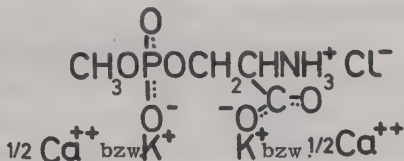
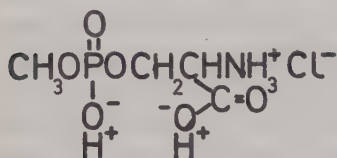
Zwitterion mit H^+ , K^+ und Ca^{2+} in H_2O (Abb. 21a, Seite 72)



Zwitterion H^+ mit zusätzlichen Gegenionenpaar HCl , KCl bzw. $CaCl_2$ in H_2O (Abb. 21b, Seite 72)

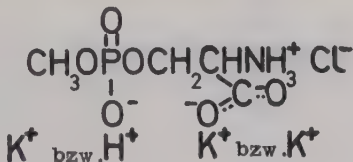
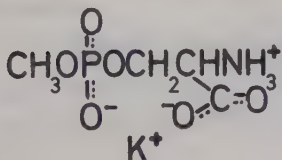


Zwitterion H^+ , K^+ bzw. Ca^{2+} mit zusätzlichen Gegenionenpaar
 HCl , KCl bzw. CaCl in H_2O (Abb. 21c, Seite 72)



Die gleichen Meßreihen wie in Abb. 21 jedoch D_2O -Lösungen (Abb. 22, Seite 73)

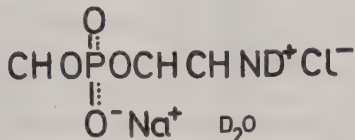
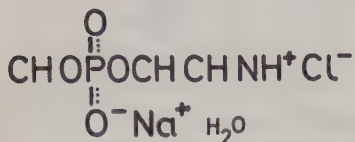
Kalium-Zwitterion, Kalium-Zwitterion mit zusätzlichem Gegen-
ionenpaar HCl bzw. KCl in H₂O (Abb. 23a, Seite 74)



Die gleichen Meßreihen, jedoch in D_2O Lösung, werden unterhalb der Spektren der H_2O -Lösungen gezeigt.

⁺) Näheres über die richtige Lage der Ionen s. Abschn. IV.1.1.

Austauschbeispiel $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$: Zwitterion mit zusätzlichem Gegenionenpaar NaCl in H_2O bzw. D_2O (Abb. 10, Seite 53)



III.2. Zuordnung der IR-Banden

III.2.1. Lösungsmittelbanden (H_2O bzw. D_2O)

Im vorderen Bereich des Spektrums bei 3400 cm^{-1} erscheint die intensive Bande der Valenzschwingung der wasserstoff-Brücken-gebundenen OH-Gruppen des Wassers. Sie verdeckt alle Banden zwischen 3600 und 3000 cm^{-1} . Um 2100 cm^{-1} befindet sich eine mittelgroße Bande, Sie ist einer Kombinationsschwingung (Scherenschwingung plus gehinderte Rotation) zugeordnet. Im Bereich um 1640 cm^{-1} taucht die Bande der Deformationsschwingung des H_2O Moleküls auf. Unterhalb 850 cm^{-1} findet man die Schwingung der gehinderten Rotation, die sich durch einen zunehmenden Anstieg der Absorption nach kleinen Wellenzahlen zu bemerkbar macht.

Die entsprechenden Banden des D_2O -Moleküls erscheinen, wegen des Isotopie-Effekts verschoben, um 2500 cm^{-1} groß und breit die OD-Valenz und um 1200 cm^{-1} die Deformation des D_2O Moleküls.

Die Verwendung von D_2O statt H_2O bei der gleichen Substanz ermöglicht die Auswertung jener Spektralbereiche, die von den H_2O Banden verdeckt werden.

in H ₂ O	in D ₂ O	Zuordnung
3420 s ⁺)		OH Valenz gebundener OH-Gruppen des H ₂ O
2976 m	2976 m	-CH ₃ asym.Valenz (65) (66)
2955 m	2955 m	-CH ₂ -asym.Valenz (65) (66)
2905 m	2905 m	-CH ₃ sym. Valenz (65) (66)
2855 m	2855 m	-CH ₂ -sym. Valenz (65) (66)
1732 s	1732 s	C=O Valenz (67)
1642		H ₂ O Scherenschwingung
	1628 ⁺⁺)s	-CO ₂ ⁻ asym.Valenz (65)
1528 m		-NH ₃ ⁺ asym.Deformation (68)
1468 m	1468 m	-CH ₂ -asym.Deformation
1414 m	1410 m	-CO ₂ ⁻ sym.Valenz (65)
1368 m	1372 m	-CH ₃ sym. Deformation
1312 m	1340 m	?
1312 m	1293 m	C-N Valenz (65)
1252 s	verdeckt	P=O Valenz (69)
1218 s	verdeckt	>PO ₂ ⁻ asym.Valenz (70)
1084 s	1080 s	C-O-(P) asym.Valenz
1056 s	1048 s	>PO ₂ ⁻ sym.Valenz (70)
1040		?
1000 sh		?
	978 m	?
916 sh		-NH ₃ ⁺ rocking (66)
	840 ⁺⁺)m	O-P-O asym.Valenz (70)
	782 ⁺⁺)w	O-P-O sym.Valenz (70)
	750 ⁺⁺)w	-ND ₃ ⁺ rocking (66)

Tabelle 2: Bandenzuordnung des Serinphosphorsäure-P-Methyl-
esters (SPM) (Dimension cm⁻¹)

⁺) s = stark, m = mittel, w = schwach, sh = Schulter

⁺⁺) Wellenzahl in D₂O gemessen

III.2.2. Zuordnung der Banden des Serinphosphorsäure-P-Methylesters (SPM)

Die Spektren des SPM findet man in Abbn. 17, 21 - 24. Die Zuordnung ist in Tab. 2 zusammengestellt. Durch die Anwesenheit von drei funktionellen Gruppen im SPM Molekül zeigt dieses Molekül eine Vielzahl von Banden. Ich habe die Spektren sämtlicher erwähnter Kombinationen aufgenommen, miteinander verglichen und zu verschiedenen Gruppen zusammengefaßt. Aus allen Spektren der Salze werden repräsentativ die Spektren mit Kalium und Calcium als Gegenion bzw. als Vertreter der Alkali und Erdalkali Ionen gezeigt. Schließlich werden die Spektren der protonierten und deprotonierten Lösungen in H_2O und in D_2O verglichen.

$-CH_3$, $-CH_2$ -und NH_3^+ Valenzschwingung

In allen Spektren der H_2O Lösungen beobachtete ich als Schultern zwischen 3000 und 2500 cm^{-1} die Banden der $-CH_3$, $-CH_2$ - und NH_3^+ Valenzschwingungen. In den Spektren der D_2O Lösungen wurde die genaue Lage der antisymmetrischen und der symmetrischen $-CH_3$ Valenzschwingungen mit 2975 bzw. 2905 cm^{-1} und die der $-CH_2$ -Valenzschwingung mit 2955 und 2855 cm^{-1} (65) ermittelt. Die $-NH_3^+$ Valenzschwingungen bei 3000 und 2550 cm^{-1} (66) erscheinen nach dem H-D Austausch bei 2237 und 1982 cm^{-1} .

C=O Valenzschwingung

Die Bande bei 1732 cm^{-1} gehört der C=O Valenzschwingung und verschwindet mit zunehmender Deprotonierung (67). Ihre volle Größe und das völlige Verschwinden sind sehr eindrucksvoll in den Spektren der D_2O Lösungen (Abb. 17b) zu sehen.

In der Abb. 21a ist sie im H^+ -Zwitterion intensiv, im Ca^{2+} -Zwitterion als leichte Schulter und im K-Zwitterion überhaupt nicht zu beobachten (Formel dazu s. Abschnitt III.1.1.). Die Unterschiede der gleichen Kombination sind in den Spektren der D_2O Lösungen in (Abb. 22a) noch deutlicher zu erkennen. Was als Schulter beim Ca^{2+} -Zwitterion auftrat, ist hier als ausgeprägte Bande zu sehen.

Asymmetrische CO_2^- Valenzschwingung

Unter der H_2O -Deformationsschwingung um 1640 cm^{-1} vermutete ich die asym. Deformationsschwingung des $-\text{CO}_2^-$ Ions. Sie wurde durch den H-D Austausch freigelegt. Ihre genaue Lage ist 1628 cm^{-1} (65). Die Veränderungen in den Spektren sind in den D_2O -Lösungen deutlicher zu erkennen, da die H_2O -Deformationsschwingung sich nicht überlagert. Diese Bande bei 1628 cm^{-1} ist ebenfalls je nach Protonierungsgrad verschieden groß. Im D^+ -Zwitterion (Abb. 22a) ist sie relativ kräftig zu sehen, denn sie muß ihre Intensität mit der $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung teilen, die noch da ist. Sie wird am intensivsten beim K-Zwitterion (Abb. 22a), wo die $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung völlig entfällt. Entsprechend sind die Unterschiede zwischen dem K^+ - bzw. Ca^{2+} -Doppelsalz und dem 100% protonierten SPM Molekül (Abb. 22c) sowie zwischen H^+ -Zwitterion plus KCl und CaCl_2 . Die große kräftige asymmetrische Karboxylatbande tritt hiernach mehr oder weniger intensiv mit gleichzeitigem Verschwinden der $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung auf.

Asymmetrische NH_3^+ Deformationsschwingung

Im Gebiet zwischen 1550 und 1300 cm^{-1} befinden sich mehrere Banden teils kräftig, teils als kleinere Schultern. Die meisten von ihnen nehmen mit zunehmender Protonierung langsam ab und sind beim Zwitterion fast verschwunden. Aus dem Vergleich zwischen den Spektren der H_2O - D_2O -Lösungen sowie aus manchen Verschiebungen und theoretischen Überlegungen konnte ich die Herkunft dieser Banden aufklären. Eine davon, die bei 1528 cm^{-1} , ist bei sämtlichen Protonierungsgraden anwesend und nimmt bei über 100% Deprotonierung ein wenig ab. Sie ist der asymmetrischen Deformationsschwingung (68) zuzuschreiben. Ihre Lage ist protonierungsabhängig (s. Abschnitt IV.1.). Im Spektrum der D_2O -Lösung ist sie verschwunden und erscheint wieder bei 1192 cm^{-1} als $\nu_{\text{as}}\text{-ND}_3^+$.

CH₃, -CH₂-Deformations- und symmetrische CO₂⁻-Valenzschwingung

Bei 1466 und 1452 cm⁻¹ finden sich die Banden der asymmetrischen -CH₂- bzw. -CH₃-Deformationsschwingung. Die erste ist die einzige Bande in der Gegend, die bis zu 100% Protonierung der SPM Moleküle weder verschwindet noch ihre Lage verändert (s. Abschnitt IV.1.).

Eine kleine Schulter bei 1368 cm⁻¹ gehört der symmetrischen -CH₃ Deformationsschwingung. Die letzte Bande in diesem Spektralbereich bei 1312 cm⁻¹ verschiebt sich beim Deuterieren etwas nach kleineren Wellenzahlen, nämlich nach 1293 cm⁻¹, wahrscheinlich handelt es sich um die C-N Valenzschwingung, die durch die drei an das N gebundene H Atom beim Deuterieren den geringfügigen Isotopieeffekt verursacht.

In der Abb. 21b sind alle diese Banden mit Ausnahme der Banden bei 1466 cm⁻¹ in einem Kontinuum aufgegangen (s. Abschnitt III.3.1.). Die symmetrische Valenzschwingung des -CO₂⁻ Ions tritt bei 1414 cm⁻¹ auf (65), ihre Lage ist ionenabhängig. Mit zunehmender Protonierung nimmt ihre Intensität ebenso wie die der asymmetrischen Schwingung ab. In der Abb. 21a erscheint sie im Ca²⁺-Zwitterion Spektrum bei etwas höherer Wellenzahlen. In den Spektren der D₂O-Lösungen Abb. 22 sind alle verschwundenen Banden im mittleren Spektralbereich wieder in ihrer vollen Größe zu sehen.

Die Banden der Phosphatgruppe

In der Gegend zwischen 1250 und 1000 cm⁻¹ dominieren die Phosphatbanden. Bei 1252 cm⁻¹ tritt mit zunehmender Protonierung eine starke Schulter, die der P=O Valenzschwingung zuzuschreiben ist, auf (69). Sie verschwindet völlig mit zunehmender Deprotonierung. Die asymmetrische und die symmetrische >PO₂⁻ Valenzschwingungen treten als sehr starke Banden bei 1218 bzw. 1056 cm⁻¹ auf (70), dazwischen auch sehr intensiv bei 1084 cm⁻¹ die C-O-(P) Valenzschwingungen.

Die Ursache dieser augenfälligen Protonierungsabhängigkeit im Gebiet der Phosphatbanden in der Abb. 21a beruht darauf, daß bei 100% Deprotonierung $>\text{P}^{\text{O}^-}_{\text{O}}$ Ionen anwesend sind, während mit zunehmender Protonierung $>\text{P}^{\text{O}}_{\text{OH}}$ Gruppierungen entstehen.

Gebiet unter 1000 cm^{-1}

Unterhalb 1000 cm^{-1} werden alle Spektren von den Torsionsschwingungen des Wassers beherrscht. Diese maskieren das Spektrum so weitgehend, daß nur wenige Banden als Schultern erscheinen. Der H-D Austausch zeigt, daß es sich vermutlich bei der Bande bei 916 cm^{-1} um die $-\text{NH}_3^+$ Rocking-Schwingung handelt. Die $-\text{ND}_3^+$ Rocking-Schwingung wäre dann die Bande bei 750 cm^{-1} . Die Banden bei 840 cm^{-1} und bei 782 cm^{-1} , die beim H-D Austausch freigelegt werden, sind vermutlich ν_{as} und ν_{s} der O-P-O Gruppierung zuzuschreiben (Tab. 2). Die Banden in diesen Bereichen liefern jedoch keine großen Hinweise bezüglich unserer Fragestellungen.

III.2.3. Zuordnung der Banden des Colaminphosphorsäure-Methylesters (CPM)

Abb. 10 zeigt die IR Spektren einer H_2O und einer D_2O Lösung des Zwitterions des CPM mit NaCl als Gegenionenpaar. Die Zuordnung ist in Tab. 3 zusammengestellt. Der vordere Spektralbereich sowie die Gegend um 1600 und unter 1000 cm^{-1} werden wie bei allen Spektren der H_2O Lösungen von den Banden des Wassers beherrscht.

Die antisymmetrischen und die symmetrischen Valenzschwingungen der $-\text{CH}_3$ Gruppe sind bei 2990 und 2908 cm^{-1} zu beobachten, während man die entsprechenden Banden der $-\text{CH}_2$ -Gruppe bei 2960 und 2855 cm^{-1} im Spektrum H_2O -Lösungen als kleine Schultern und in dem der D_2O -Lösung als richtige Banden findet. Im mittleren Spektralbereich erscheint die $-\text{NH}_3^+$ Deformationsschwingung bei 1526 cm^{-1} . Daneben tauchen die Deformationsbanden der $-\text{CH}_3$ bei 1458 und 1376 cm^{-1} sowie die der $-\text{CH}_2$ -Gruppe bei 1468 und 1408 cm^{-1} auf. Es handelt sich jeweils um die antisymmetrische bzw. um die symmetrische. Die Phos-

phatbanden finden sich zwischen 1250 und 1000 cm^{-1} und zwar bei 1216 cm^{-1} die asymmetrische und bei 1050 cm^{-1} die symmetrische Valenzschwingung des >PO_2^- Ion. Eine P=O Doppelbindung wird hier nicht beobachtet. Man findet bei großen Protonierungsgraden lediglich eine wesentliche Verbreiterung der Bande bei 1200 cm^{-1} (näheres s. Abschnitt IV.2.1.). In dieser Gegend trifft man noch die C-O-(P) Bande bei 1080 cm^{-1} .

Unter 1000 cm^{-1} macht sich wieder die Wasser-Torsion bemerkbar. Auch hier ist, wie bei SPM die Bande, die beim H-D Austausch von 912 cm^{-1} nach 720 cm^{-1} rückt, die rocking Schwingung der -NH_3^+ bzw. ND_3^+ Gruppierung. Während es recht wahrscheinlich ist, daß die Banden beim 830 cm^{-1} und 786 cm^{-1} ν_{as} und ν_{s} der O-P-O Gruppierung zuzuschreiben sind.

in H ₂ O		in D ₂ O		Zuordnung
3420	s ⁺)			OH Valenz gebundener OH Gruppen des H ₂ O
2960	m	2960	m	-CH ₃ asym.Valenz (65) (66)
2960	m	2960	m	-CH ₂ - asym.Valenz (65) (66)
2908	m	2908	m	-CH ₃ sym.Valenz (65) (66)
2855	m	2855	m	-CH ₂ - sym.Valenz (65) (66)
1642	s			H ₂ O Scherenschwingung
1526	m			-NH ₃ ⁺ asym.Deformation (68)
1468	m	1468	m	-CH ₂ - asym.Deformation (68)
1458	m	1458	m	-CH ₃ asym.Deformation (68)
1408	w	1408	w	-CH ₂ - sym.Deformation
1376	w	1376	w	-CH ₃ sym.Deformation
1288	w	verdeckt		C-N Valenz (65)
1216	s	verdeckt		>PO ₂ ⁻ asym.Valenz (70)
1080	s	1088	s	C-O-(P) asym.Valenz
1050	s	1052	s	>PO ₂ ⁻ sym.Valenz (70)
1022	s			?
		982	m	?
910	m			-NH ₃ ⁺ Rocking (66)
		830	m	O-P-O asym.Valenz (70)
		786	m	O-P-O sym.Valenz (70)
		720	w	-ND ₃ ⁺ Rocking (66)

Tabelle 3: Bandenzuordnung des Colaminphosphorsäure-P-Methylesters (CPM) (Dimension cm⁻¹)

⁺) s. Tabelle 2

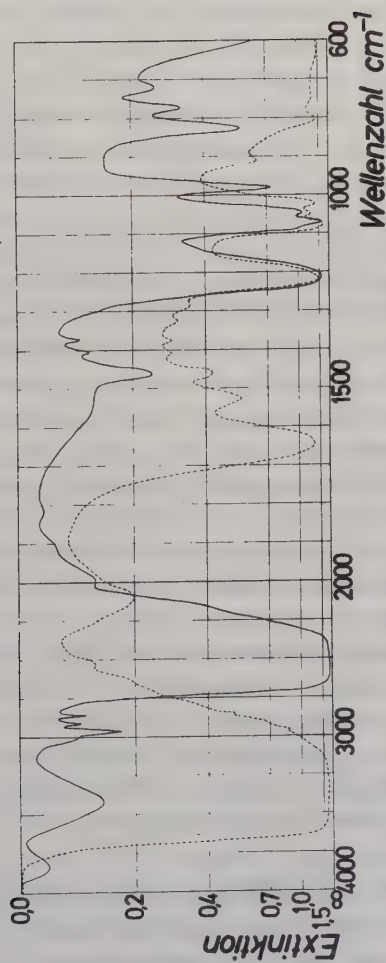


Abb. 10: Colaminphosphorsäure-Methylester. Austauschbeispiel
 ----- Zwitterion mit NaCl als Gegenionenpaar in H_2O
 ----- Zwitterion mit NaCl als Gegenionenpaar in D_2O

III.3. Kontinuumsabsorption: Theorie

Wir werden im folgenden sehen, daß man in allen Serien der Spektren bei Deprotonierung oder Protonierung der Modellsubstanzen (Abb. 17, 26) eine kräftige Untergrundabsorption beobachtet. Diese Kontinuumsabsorption fängt im Bereich der Valenzschwingungen der OH-Brücken des Wassers bei 3200 cm^{-1} an und erstreckt sich häufig bis zu kleinen Wellenzahlen, bisweilen jedoch auch nur bis ca. 1700 cm^{-1} . Im letzten Fall tritt sie dann bei Wellenzahlen kleiner 1000 cm^{-1} wieder mehr oder weniger kräftig auf. Dieses Phänomen wurde zuerst von Suhrmann und Breyer (71) im Bereich der IR Oberschwingungen beobachtet. Wicke, Eigen und Ackermann (72) überprüften diese Arbeit und postulierten, anknüpfend an kalorimetrische Untersuchungen, als Ursache des Effektes die Fluktuation eines Ueberschußprotons in der H_9O_4^+ Gruppierung. Ackermann (73) (74) beobachtete dieses Kontinuum bei wäßrigen Säurelösungen im Grundschriftungsbereich und Zundel et al. fand den Effekt an vielen $(\text{BH}\cdots\text{B})^+$ bzw. $(\text{BH}\cdots\text{B})^-$ enthaltenden Systemen (75) - (80). Bei den Untersuchungen in (81) stellte es sich heraus, daß im wäßrigen Milieu die entscheidende Gruppierung nicht die Gruppierung H_9O_4^+ sondern vielmehr die Gruppierung H_5O_2^+ ist. Als man später als Ursache des Kontinuums die extrem große Polarisierbarkeit derartiger Wasserstoff-Brücken erkannte (82), (83), wurde dies verständlich, denn in der Gruppierung H_9O_4^+ ist jede der Wasserstoff-Brücken jeweils durch die Dipolfelder der zusätzlichen beiden Wassermoleküle so stark polarisiert, daß das Proton in keiner der Brücken mehr fluktuieren kann. Demgegenüber fluktuiert das Proton in der Gruppierung H_5O_2^+ , wenn sich diese in einer einigermaßen symmetrischen Umgebung befindet (84).

III.3.1. Symmetrische H^+ -Brücken und Polarisierbarkeit

In der Wasserstoff-Brücke eines im Wasser tunnelnden Ueberschußprotons liegt ein symmetrisches Potential vor; denn wenn man die zwei Sauerstoffatome, zwischen denen das

Proton tunnelt, getrennt jeweils als ein Wasserstoff-Akzeptor, bzw. Wasserstoff-Donatoratom betrachtet, sieht man, daß beide Atome gleich kräftig sind. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit an beiden ist demnach gleich groß. Damit sind die Verhältnisse durch die beiden Protongrenzstrukturen, die Abb. 11 zeigt, darzustellen.

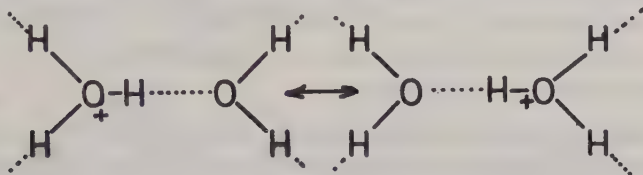


Abb. 11: Proton-Grenzstrukturen (in wässriger Säurelösung)

Darüber hinaus ergab es sich, daß es sich bei dem Potential im Fall H_5O_2^+ um ein Doppelminimumpotential mit sehr sehr niedriger Schwelle handelt.

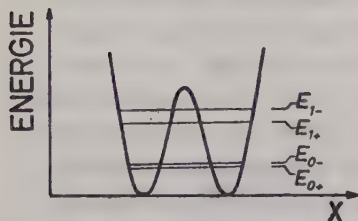


Abb. 12: Energieniveau im Potential mit Doppelminimum

Eine kontinuierliche Absorption, wie sie in den IR-Spektren vorkommt, ist jedoch durch den Tunneleffekt allein nicht erklärlich. Hier müssen weitere Faktoren eine Rolle spielen. Weidemann und Zundel (82) untersuchten in diesem Zusammenhang die Polarisierbarkeit solcher H^+ -Brücken und fanden Werte, die das hundertfache normaler Elektronen-Polarisierbarkeitswerte überschreiten.

Die Erklärung hierzu liegt in der quantenmechanischen Eigenart des Systems mit tunnelndem Proton. Wellenmechanisch ist sein Grundzustand symmetrisch, während der angeregte Zustand antisymmetrisch ist. Die Energie des angeregten Zustandes unterscheidet sich sehr wenig von der des Grundzustandes, d. h. ein kleines elektrisches Feld ist in der Lage, den Grundzustand dem angeregten beizumischen. Das hat eine unsymmetrische Ladungs-

verteilung, d. h. die hohe Polarisierbarkeit zur Folge.

Die große Polarisierbarkeit bei Wasserstoff-Brücken der Art $(BH \cdots B)^+$ bewirkt, verschiedene Wechselwirkungen dieser Brücken mit ihrer Umgebung: 1. Protonendispersionskräfte der Wasserstoff-Brücken untereinander, 2. eine Induktionswechselwirkung dieser Wasserstoff-Brücken mit Feldern aus ihrer Umgebung und 3. eine Wechselwirkung der Uebergänge in den Wasserstoff-Brücken mit den Uebergangsmomenten der zwischenmolekularen Schwingungen.

Zunächst zu den Protonendispersionskräften (77): Die Abschätzung dieser Korrelationskräfte ergab, daß je nachdem Abstand (s. Abb. 13a) und der Orientierung der Brücken zueinander eine unterschiedliche starke Kopplung vorhanden ist, wobei die Tunnelfrequenz, das Dipolmoment einer H^+ -Grenzstruktur und die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels eine Rolle spielen. Dies bewirkt eine Kontinuität von Energieniveaus. Die Induktionswechselwirkung ergab sich bei der Betrachtung der Verschiebung der Energieniveaus durch ein elektrisches Feld (82) (83). Dies zeigt Abb. 13a. Das unterste Energieniveau wird abgesenkt, d. h. es handelt sich um Anziehungskräfte. Auch hier kommt durch die Mannigfaltigkeit von Abständen und Orientierungen zwischen den Wasserstoff-Brücken und den Ionen und den Dipolen der Solvatmoleküle eine Mannigfaltigkeit von Energieniveaudifferenzen zustande.

Zusammenfassend kann man die Entstehung der Energiebänder, bzw. die kontinuierliche Energie-Verteilung in Systemen mit tunnelnden Protonen als das Ergebnis dreier Effekte betrachten. Erstens Wechselwirkung zwischen tunnelnden Protonen, d. h. Kopplung der Tunnelbewegung über die Korrelationskräfte, zweitens Polarisierung der Wasserstoff-Brücken durch die elektrischen Anionen und Solvatmolekül-Felder und drittens Wechselwirkung der Uebergänge in diesen Brücken mit den Uebergangsmomenten der zwischenmolekularen Schwingungen. Diese Wechselwirkungen verursachen bei symmetrischen Wasserstoff-

Brücken mit Doppelminimum oder sehr breiter flacher Potentialmulde das Auftreten einer kontinuierlichen Absorption, die bei ca. 3200 cm^{-1} beginnt und sich kontinuierlich nach kleinen Wellenzahlen erstreckt. Umgekehrt kann die Beobachtung einer solchen Kontinuumsabsorption als Nachweis für die Anwesenheit von symmetrischen, extrem leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken dienen.

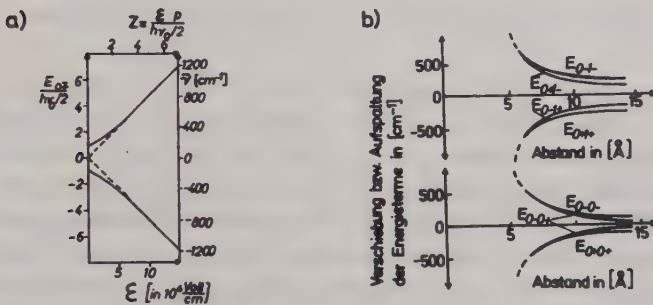


Abb. 13a: Verschiebung der Energieniveaus E_{O+} und E_{O-} eines Tunnelprotons durch ein elektrisches Feld

13b: Verschiebung bzw. Aufspaltung der Energieniveaus von zwei Tunnelprotonen durch die Protonendispersionskräfte

III.3.2. Unsymmetrische H^+ -Brücken mit Doppelminimum

Eine H^+ -Brücke ist unsymmetrisch, wenn Akzeptor und Donator verschieden sind, d. h. insbesondere, wenn diese unterschiedliche Basizitäten aufweisen. Ist der Akzeptor stärker, dann sieht der Potentialverlauf wie in der Abb. 14a aus. Wenn dagegen die Basizität des Donators überwiegt, dann sieht das Bild so aus, wie es Abb. 14b zeigt.

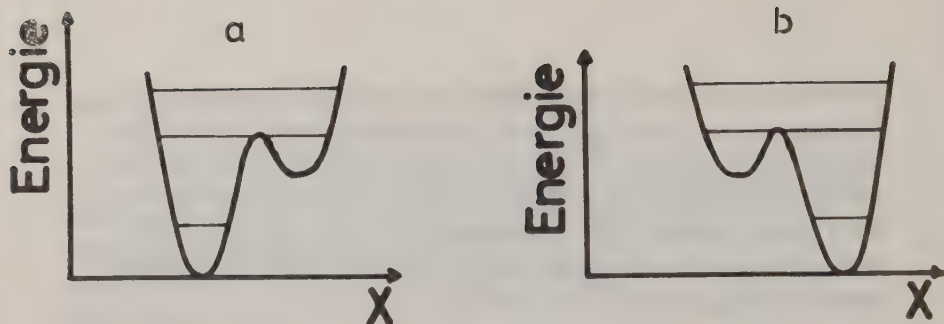


Abb. 14: Potentialverlauf in verschiedenen H^+ -Brücken

Die unterschiedliche Basizität kann einerseits dadurch zustande kommen, daß es sich bei Akzeptor und Donator um verschiedene Atome handelt, aber auch bei gleichen Atomen in unterschiedlicher chemischer Umgebung treten ungleiche Basizitäten auf. Wenn nun die Basizität von Donator und Akzeptor nicht zu verschieden ist, treten unsymmetrische Wasserstoff-Brücken mit Doppelminimum oder mit Wendepunkt im Potential auf. Diese sind - wenn auch nicht so leicht, wie die symmetrischen - so doch auch noch weit polarisierbarer als Elektronensysteme (83). Abb. 15 zeigt den Potentialverlauf bei "symmetrischen" Wasserstoff-Brücken im elektrischen Feld. Man sieht hier nochmals recht anschaulich, wie die Kontinuität von Energieniveaudifferenzen im Fall des symmetrischen Doppelminimums zustande kommt. Weiter entnimmt man dieser Abbildung, daß wenn man eine von Natur aus unsymmetrische Wasserstoff-Brücke mit Doppelminimum vorliegen hat, daß dann nur Uebergänge im Bereich größerer Wellenzahlen auftreten. Solche unsymmetrischen polarisierbaren Wasserstoff-Brücken verursachen damit Kontinua im Bereich $3000 - 1700\text{ cm}^{-1}$. Umgekehrt zeigen derartige Kontinua die Anwesenheit derartiger unsymmetrischer leicht polarisierbarer Wasserstoff-Brücken an. Der Befund, daß bei solchen Brücken bisweilen auch im Bereich unter 1000 cm^{-1} eine kontinuierliche Absorption zu beobachten ist, beruht auf der Kopplung der Uebergangsmomente in diesen Wasserstoff-Brücken mit den zwischenmolekularen Schwingungen insbesondere mit den Torsionsschwingungen der Wassermoleküle.

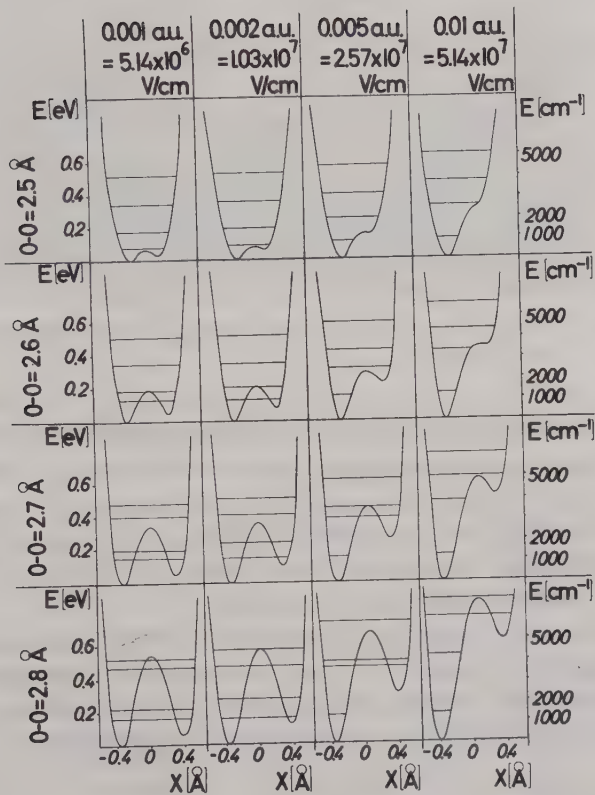


Abb. 15: Doppelminimum und Potentialverlauf bei verschiedenen Feldstärken und verschiedenen O-O Abständen

IV. Ergebnisse bei den Modellssubstanzen und deren Diskussion

IV.1. Serinphosphorsäure-P-Methylester (SPM)

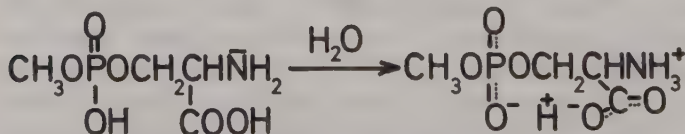
An Hand der in Abschn. III.2.2. zugeordneten Banden und einer kontinuierlichen Absorption, deren Theorie im Abschn. III.3. besprochen wurde, werden in diesem Kapitel alle Effekte analysiert und ihre Ursache an Hand theoretischer Ueberlegungen diskutiert. Abb. 17 zeigt Spektren von H_2O und D_2O Lösungen des SPM Moleküls in Abhängigkeit von Deprotonierung und Protonierung. Diese Serien will ich zunächst betrachten, anschließend werde ich auf die verschiedenen Salze eingehen.

IV.1.1. Deprotonierungs- und Protonierungs-Serie

Das H^+ -Zwitterion (Abb. 17a)

Dieser Protonierungszustand ist besonders wichtig, denn in seinem Spektrum spiegelt sich jene Situation wieder, die sich bei einer innermolekularen Wasserstoff-Brücken-Bindung mit Doppelminimum-Potential ergibt.

Im Abschnitt II.2.2. wurde bereits erwähnt, daß sich beim Auflösen der Substanz im Wasser die Protonen zwischen den zwei negativen Gruppen des Moleküls verteilen müssen, denn die pKa Werte dieser beiden Gruppen sind vergleichbar.



Wie eigenartig die Lage dieses Protons ist, kann man aus dem Bild der naturgetreuen Vergrößerung des Moleküls und aus dem Foto des Kalottenmodells erkennen (Abb. 16). Die Winkel und die Entfernung der Sauerstoff-Atome ermöglichen die Bildung einer innermolekularen Wasserstoff-Brücke.

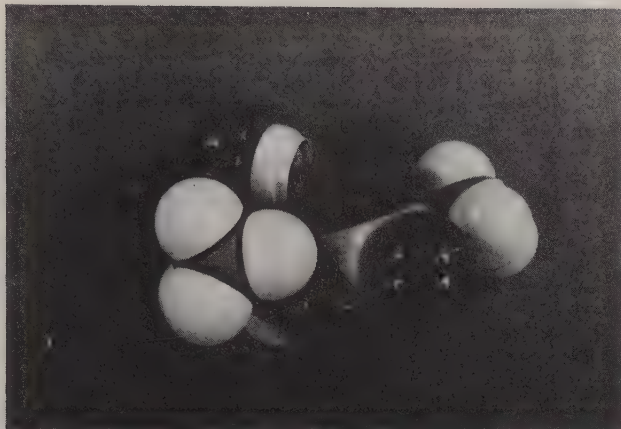


Abb. 16: Serinphosphorsäure-Methylester im Modell

Im Spektrum des H^+ -Zwitterions beobachtet man die folgenden Banden. Deren Intensität ändert sich - wie wir in folgendem sehen werden - in charakteristischer Weise mit der Protonierung.

entsteht beim	Bande	Zuordnung	zu beobachten im Spektrum
Protonieren	1732 cm^{-1}	$V_{C=O}$ im $-C(=O)OH$	besonders gut zu erkennen im Spektrum der D_2O Lösung.
Deprotonieren	1628 cm^{-1} 1414 cm^{-1}	V_{as} V_s } des $-C(=O)O^-$	die Bande bei 1628 cm^{-1} ist im Fall der H_2O Lösung verdeckt. Bei der D_2O Lösung jedoch als intensive Bande zu erkennen.
Protonieren	1252 cm^{-1}	$V_{P=O}$ im $>P(=O)OH$	die Banden bei 1252 und 1218 cm^{-1} sind in den D_2O Lösungen durch die D_2O Scherenschwingung verdeckt.
Deprotonieren	1218 cm^{-1} 1056 cm^{-1}	V_{as} V_s } des $>P(=O)O^-$	

Der Befund, daß man all diese Banden beim H^+ -Zwitterion beobachtet, liefert das wichtige Ergebnis, daß das Proton in der inneren molekularen Wasserstoff-Brücke im SPM Molekül eine mehr oder weniger große Aufenthaltswahrscheinlichkeit sowohl an der Karboxyl- wie auch an der Phosphatgruppe hat. D. h. aus der

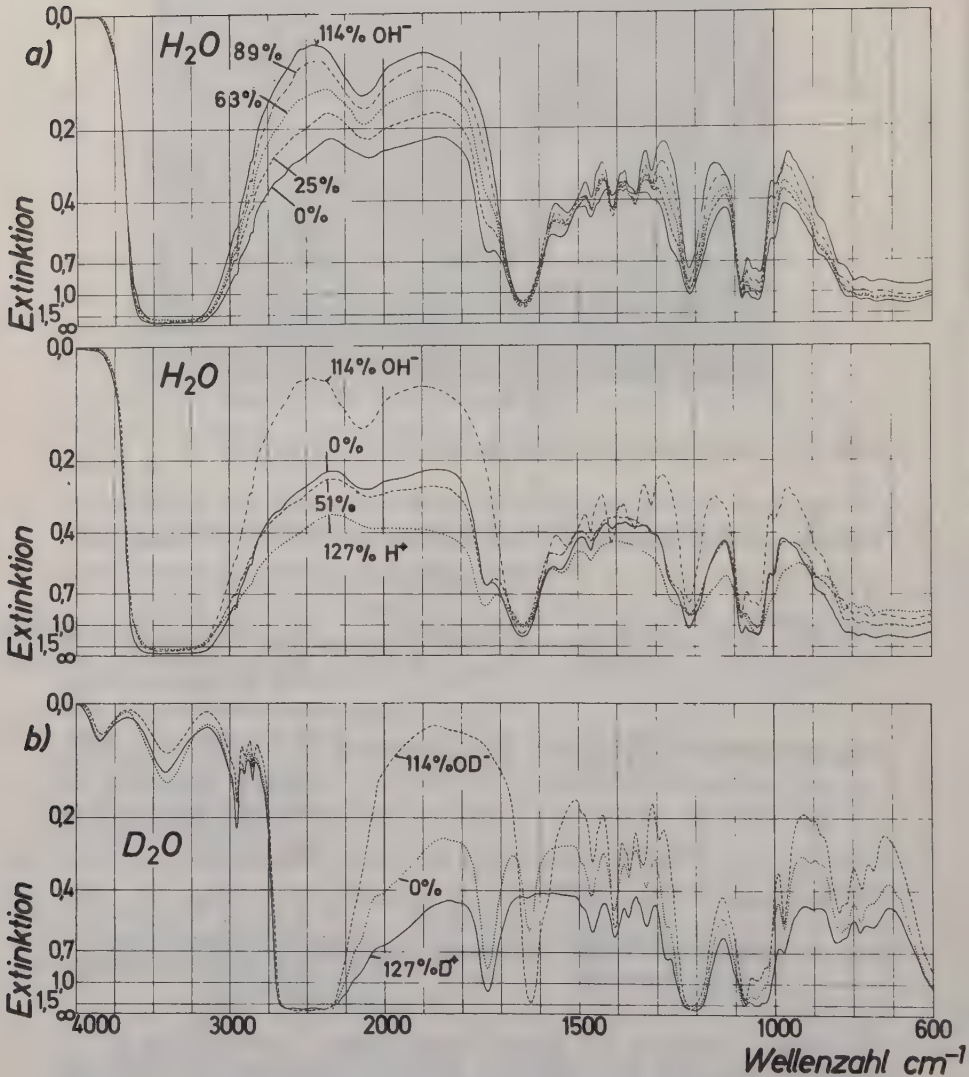


Abb. 17: Spektren des Serinphosphorsäure-P-Methylesters

a) oben: Deprotonierungsreihe: in H₂O

mitte: ----- 114% OH⁻

——— 0% (H⁺-Zwitterion)

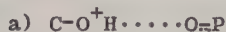
----- 51% Protonierung

..... 127% H⁺: in H₂O

b) ----- 114% OD⁻..... 0% (D⁺-Zwitterion)

——— 127% D⁺: in D₂O

Anwesenheit sämtlicher Banden folgt, daß sich das Proton weder an der einen noch an der anderen Gruppe dauernd aufhält. Es fluktuiert zwischen den beiden Anionen. Damit ist es durch die Proton-Grenzstrukturen darzustellen.



Hiernach liegt in dieser Wasserstoff-Brücke ein unsymmetrisches Doppelminimum-Potential vor, wie es Abb. 14 zeigt. Beim H^+ -Zwitterion ist die $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ bei 1732 cm^{-1} wesentlich intensiver als die Schulter der $\nu_{\text{P}=\text{O}}$ bei 1252 cm^{-1} , dies legt es nahe, daß die tiefere Mulde des Doppelminimums an der Karboxyl-Gruppe liegt, d. h. daß die Grenzstruktur a bevorzugt ist. Mit anderen Worten, das Proton hält sich im Schnitt länger an der Carboxyl- als an der Phosphatgruppe auf. All dies wird durch die im folgenden diskutierte Beobachtung einer kontinuierlichen Absorption bestätigt, denn der Untergrund im Spektrum ist im Bereich $3000 - 1700\text{ cm}^{-1}$, d. h. im Bereich großer Wellenzahlen stark angehoben, im mittleren Spektralbereich ist die Anhebung dagegen minimal. Dieser Kontinuumsverlauf zeigt nach der Theorie im Abschn. III.3., daß eine unsymmetrische leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücke anwesend ist. In solchen Wasserstoff-Brücken liegt ein Doppelminimumpotential vor. Bei dieser Wasserstoff-Brücke kann es sich hiermit nur um die diskutierte innermolekulare Wasserstoff-Brücke zwischen der Karboxyl- und der Phosphatgruppe handeln. Die Kontinuität von Energieniveaus entsteht - wie im Abschnitt III.3. ausführlich diskutiert, durch die polarisierbarkeitsverursachte Wechselwirkung dieser Wasserstoff-Brücken mit ihrer Umgebung.

Beim H^+ -Zwitterion sind zahlreiche Banden im Bereich $1500 - 1300\text{ cm}^{-1}$ nicht zu beobachten, die man in der deprotonierten Form, d. h. beim Na^+ -Zwitterion findet. Dies erklärt sich vermutlich, da zufolge der großen Polarisierbarkeit der Wasserstoff-Brücken die Uebergänge in dieser Wasserstoff-Brücke mit den Uebergangsmomenten der verschiedenen Schwingungen koppeln. Damit gehen diese im Kontinuum auf. Als einzige Bande findet man in diesem Bereich die Deformation von $-\text{CH}_2-$ bei 1468 cm^{-1} . Ihr Uebergangsmoment steht senkrecht zu dem der Wasserstoff-

Brücke und koppelt demnach nicht.

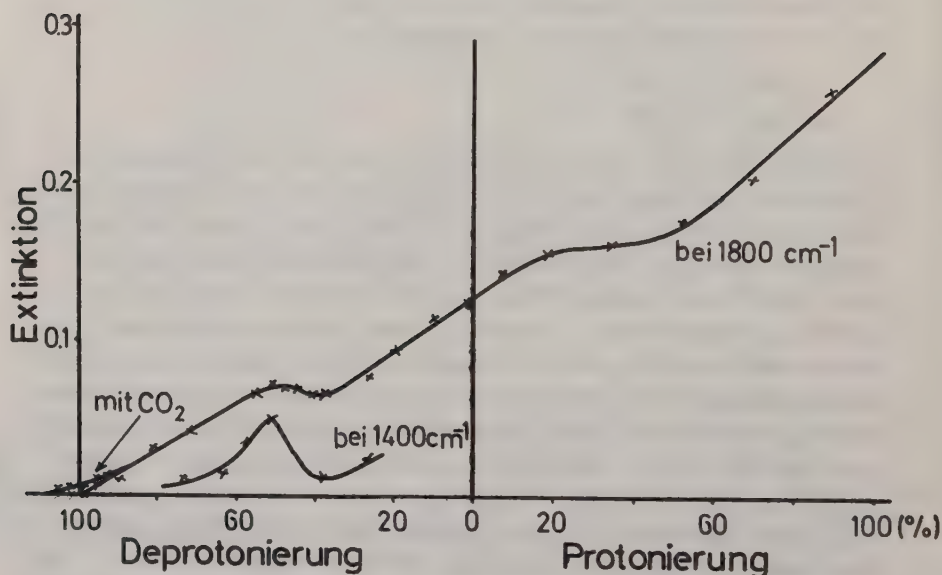
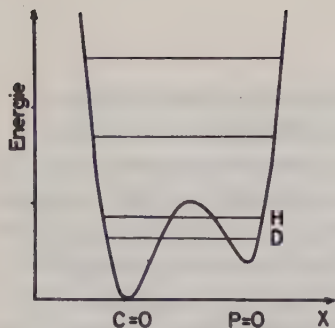


Abb. 18: Serinphosphorsäure-P-Methylester
Kontinuumsabsorption in Abhängigkeit von der Deprotonierung und Protonierung

Wenn wir in der Lage wären, die Eigenschaften einer weniger polarisierbaren Brücke an dieser Stelle des Moleküls zu studieren, hätten wir die verschwundenen Banden sehen müssen. Diese Möglichkeit ist uns durch das Deuterium gegeben. Im D^+ Zwitterion (Abb. 17b) erscheinen alle Banden zwischen 1500 und 1300 cm^{-1} in ihrer vollen Größe, denn hier liegt eine Deuteriumbrücke ($P-O \cdots D^+ \cdots O-C$) mit einer kleineren Polarisierbarkeit vor. Diese Brücke ist aus folgenden Gründen weniger polarisierbar: Das Deuteron befindet sich tiefer als das Proton im Potentialtopf und kann damit nicht so leicht in die höhere Mulde übertreten (Abb. 19), d. h. das Deuteron verteilt



sich schlechter in der Brücke. Damit ist die Polarisierbarkeit und die Kopplung demnach nicht so stark. Die Schwingungen der dazwischen liegenden Molekülgruppen werden nicht angekoppelt.

Abb. 19: Lage des Energieniveaus des Protons bzw. Deuteronen im Potentialtopf

Deprotonierung 0 bis 50%

Mit beginnender Neutralisation der Protonen nimmt die Anzahl der unsymmetrischen polarisierbaren Brücken im Molekül ab. Diese Abnahme kann sehr schön an den Spektren verfolgt werden. Die $C=O$ und $P=O$ Valenzschwingungsbanden bei 1732 und 1252 cm^{-1} verlieren kontinuierlich an Stärke und sind beim Spektrum der 50% deprotonierten Proben nur noch als flache Schultern zu erkennen. Die asymmetrische und symmetrische Valenzschwingungsbanden des Karboxylat- und Phosphations, deren Anteile, wie wir schon gesehen haben, mit abnehmender Protonierung zunehmen, werden kräftiger.

In der Abb. 18 wird die Extinktion des Kontinuums in Abhängigkeit von Deprotonierung und Protonierung gezeigt. Die Extinktion des Kontinuums nimmt im Bereich zwischen 0 und 40% Deprotonierung linear mit der Deprotonierung ab, was ebenfalls das Verschwinden der unsymmetrischen polarisierbaren Wasserstoff-Brücken mit Doppelminimum anzeigt.

Deprotonierung 50%

Diese Protonierungsstufe weist eine interessante Unterbrechung der linearen Kontinuumsabnahme auf. Wie man in der Abb. 18 sieht, nimmt das Kontinuum bei 50% leicht zu, um dann bei weiterer Deprotonierung wieder abzunehmen.

Es müssen sich also mit abnehmender Deprotonierung um 50% Wasserstoff-Brücken bilden, die einen größeren Beitrag zum Kontinuum liefern, als die unsymmetrischen. Es liegt nahe, daß es sich hierbei um symmetrische zwischenmolekulare Wasserstoff-Brücken handelt, d. h. um Brücken mit gleich starken Partnern (s. Abschnitt III.3.), denn bei 50% Protonierung steht $1/2 \text{ H}^+$ für zwei bzw. ein Proton für vier negative Gruppen zur Verfügung, die dann von zwei Molekülen stammen. Derartige symmetrische stark polarisierbare Wasserstoff-Brücken müssen jedoch auch im mittleren Spektralbereich, d.h. von $1600 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ eine kontinuierliche Absorption liefern. Dies ist in der Tat der Fall. Die untere Kurve in Abb. 18 zeigt den Verlauf der Extinktion des Kontinuums um 1400 cm^{-1} . Die Extinktion nimmt in diesem Bereich, wie erwartet, zu, um dann mit weiterer Deprotonierung rasch wieder abzufallen. Dies zeigt, daß sich tatsächlich die vermuteten symmetrischen extrem leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken gebildet haben.

Deprotonierung 50 - 100%

Unter 50% nimmt das Kontinuum wieder linear mit der Deprotonierung ab. Die fortschreitende Neutralisation reduziert die Anzahl der Wasserstoff-Brücken bis die Kontinuumsabsorption bei 0% verschwunden ist. Hiermit gibt es keine extrem leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken in den Systemen mehr. Dieser Befund wird dadurch bestätigt, daß bei 100% Deprotonierung die C=O Valenzschwingung bei 1732 cm^{-1} völlig verschwunden ist, was man besonders gut im Spektrum der D_2O Lösung erkennen kann. Um 100% Deprotonierung zeigt die Kurve einen etwas anderen Verlauf (Abb. 18), wenn CO_2 anwesend ist. Die Extinktion fällt etwas langsamer ab, dafür erstreckt sich der Abfall aber in den Bereich von Deprotonierungsgraden $>100\%$. Dies ist auf die Pufferwirkung der anwesenden Hydrogenkarbonat-Ionen zurückzuführen.

Deprotonierung >100%

Bei weiterer Deprotonierung beobachtet man geringfügige Veränderungen an der Bande der antisymmetrischen Valenzschwingung bei 1528 cm^{-1} . Diese sind durch die Protonenspaltung von der NH_3^+ Gruppe hervorgerufen. Es bilden sich NH_2 Gruppen. Hiermit könnten sich symmetrische $-\text{NH}_2\text{H}^+ \cdots \text{HN}_2-$ -d.h. starkpolarisierbare Wasserstoff-Brücken bilden. Nach (85) ist es jedoch bekannt, daß diese Wasserstoff-Brücken im wäßrigen Milieu kein Kontinuum verursachen, was sich ja darin äußert, daß der Untergrund nun von der Deprotonierung unabhängig ist.

Veränderungen an den Schwingungen der Wassermoleküle

Unterhalb 800 cm^{-1} beobachtet man in der Spektrenreihe zwischen 0 und 100% mit zunehmender Deprotonierung eine Abnahme der intensiven Bande der Wassertorsionen. Dies kann man verstehen, wenn man bedenkt, daß mit abnehmender Deprotonierung das Molekül aufgefaltet wird, denn die innere Wasserstoff-Brücke verschwindet. Damit stört aber das Molekül die Wasserstruktur stärker, dies führt offensichtlich zu der beobachteten Abnahme der Intensität der Torsionsschwingung.

Andererseits nimmt die Bande bei 2130 cm^{-1} mit zunehmender Protonierung zu. Sie ist bei 100% Protonierung fast vollständig verschwunden. Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um eine Kombination aus Scherenschwingung und Torsionsschwingung. Der Befund, daß diese Bande verschwindet, wenn in dem System die extrem leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken gebildet werden, erklärt sich, da das Uebergangsmoment dieser Schwingung mit den leicht polarisierbaren Brücken koppelt, damit geht die Intensität dieser Bande im Kontinuum auf.

0 bis 100% Protonierung (Abb. 17)

Protonierungen werden durch stöchiometrische Zugaben von Salzsäure zum H^+ Zwitterion erreicht.

Das erste Proton befindet sich zwischen Phosphat und Karboxylat, bevorzugt jedoch die Karboxylatgruppe. Somit muß das zweite Proton vor allem die Phosphatgruppe beeinflussen.

Aus dem Wechselspiel zwischen der Valenzschwingungsbande der protonierten und nichtprotonierten Phosphatgruppe kann dieser Vorgang leicht verfolgt werden. Die P=O Valenzschwingung bei 1252 cm^{-1} wird mit zunehmender Protonierung

intensiver, während die asymmetrische Valenzschwingung der >P=O bei 1218 cm^{-1} an Intensität verliert. Dies zeigt die Protonierung der Phosphatgruppe an. Was im einzelnen dabei vor sich geht, ergibt sich aus der folgenden Ueberlegung.

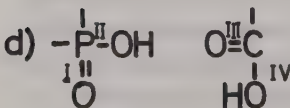
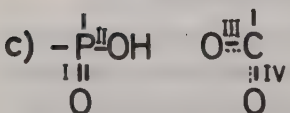
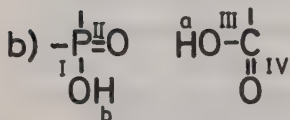
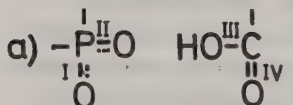


Abb. 20: Mögliche Stellungen der Protonen im SPM Molekül

Die bevorzugte Grenzstruktur des H^+ -Zwitterions ist in der Abb. 20a gezeigt. Die Bindungen II und III sind weitgehend gleich kräftig, die Bindungen I und IV haben dagegen Doppelbindungscharakter. Der Charakter der einfachen bzw. Doppelbindungen ändert sich mit der jeweiligen Lage des Protons. Das zusätzliche Proton b lagert sich nun bevorzugt an die Phosphatgruppe an Abb. 20b. Die ursprünglich gleichberechtigten Bindungen in der >PO_2^- Gruppe nehmen Einfachbindungscharakter I bzw. Doppelbindungscharakter II an. Dieser Zustand hat eine Verdrängung des Protons a zur Karboxylgruppe als Folge. Das wird durch Veränderungen an der Karboxylatgruppe bestätigt, die asymmetrische Valenzschwingung bei 1628 cm^{-1} verschwindet voll-

ständig, was man wiederum sehr schön im Spektrum der D_2O Lösung verfolgen kann. Bei 100% Protonierung ist nur noch die C=O Valenzschwingung zu finden.

Wir sind bei dieser Ueberlegung davon ausgegangen, daß beim H^+ -Zwitterion die Protongrenzstruktur bevorzugt ist, bei der sich das Proton an der Karboxylatgruppe aufhält.

Wenn man von der Grenzstruktur ausgeht, bei der das Proton an der Phosphatgruppe liegt, kommt man zu einem etwas anderen Ergebnis. Dies soll nun diskutiert werden:

Das zweite Proton b lagert sich in diesem Fall an die Carboxylgruppe an, Abb. 20d. Die gleichberechtigten Bindungen in der $-C(=O)_2$ Gruppe erhalten Doppel-(IID) bzw. Einfachbindungscharakter (IV). Das Proton wird zur Phosphatgruppe gedrängt. Die Spektren der Gruppierungen, die Abb. 20b und d zeigen, unterscheiden sich nicht voneinander. Damit kann an Hand des Spektrums zwischen diesen beiden Gruppierungen keine Entscheidung getroffen werden. Es ist anzunehmen, daß beide Gruppierungen im Gleichgewicht miteinander vorliegen.

Wir entnehmen der Abb. 18, daß das Kontinuum im Protonierungsbereich 0 - 40% nur unwesentlich zunimmt. Die sich bildenden POH^+ und COH^+ Gruppen sind sehr starke Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren, sie reißen das anwesende Cl^- Ion an sich. Es entstehen unsymmetrische ($POH^+ \cdots Cl^-$) bzw. ($COH^+ \cdots Cl^-$) Brücken. Diese Brücken verursachen kein Kontinuum. Nimmt die Protonierung weiter zu, so bewirkt die zugesetzte Säure einen steilen Anstieg der Extinktion des Kontinuums. Dies ist verständlich, denn die Lösungen werden nun stark sauer, d. h. das Wasser wird protoniert. $H_5O_2^+$ Gruppierungen treten auf mit extrem leicht polarisierbaren Wasserstoff-Brücken. Diese verursachen nun den Anstieg der Extinktion des Kontinuums.

IV.1.2. Salze von SPM

Die Spektrenserien der Salze, wie sie in den Abbildungen 21 und 24 gezeigt werden, wurden nach maximaler Representation und Aussagekraft zusammengestellt. Aus den Alkali- und Erdalkalitionen wählten wir z. B. die biologisch interessanten Kalium- und Calcium-Salze aus. Abb. 21b zeigt die Verhältnisse, wenn zusätzlich am

H^+ -Zwitterion ein Gegenionenpaar anwesend ist, d. h. sie zeigt die K^+-H^+ , $1/2 Ca^{2+}-H^+$ und H^+-H^+ Form. Die dazugehörigen Lösungen wurden durch stöchiometrische Zugabe von KCl und $CaCl_2$ hergestellt. Obwohl Kalium und Calcium Ionen anwesend sind, unterscheiden sich die Spektren von K^+-H^+ und $1/2 Ca^{2+}-H^+$ kaum von den in der Abb. 21a gezeigten des H^+ -Zwitterions. Maßgebend ist also die Anwesenheit der Protonen, die Protonen verdrängen die Ionen zwischen den funktionellen Gruppen und bilden die stark polarisierbare innermolekulare Brücke, die stets durch die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte Kontinuumsabsorption angezeigt wird. Besonders eindrucksvoll sieht man dies an den Spektren der D_2O Lösungen in der Abb. 22b. Sowohl bei Anwesenheit des K^+ , wie auch bei Anwesenheit des Ca^{2+} ist die $C=O$ Valenzschwingung intensiv. Sie ist in beiden Fällen ungefähr gleich kräftig, d. h. es bilden sich in beiden Fällen die polarisierbaren Brücken, die zusätzlichen Kationen behindern dies nicht.

Die Zusammenstellung der Zwitterionen von Kalium, Calcium und protonierter Form in der Abb. 21a zeigt den Einfluß dieser Ionen auf das Molekül. Die großen Unterschiede zwischen Ca^{2+} , K^+ einerseits und dem H^+ -Zwitterion andererseits, sind auf die innermolekularen H -Brücken des H^+ -Zwitterions zurückzuführen und wurden im vorangegangenen Abschnitt diskutiert.

Kalium- und Calcium-Zwitterion unterscheiden sich nicht wesentlich von einander, eine nähere Betrachtung der Spektren läßt jedoch Unterschiede erkennen. Die $C=O$ Valenzschwingung bei 1752 cm^{-1} ist beim Calcium-Zwitterion als Schulter zu sehen, das Spektrum des Kalium-Zwitterions weist an dieser Stelle keine Bande auf. In der Abb. 22a ist der gleiche Sachverhalt im Fall der D_2O Lösung wiedergegeben. Man erkennt, daß bei Anwesenheit der Ca^{2+} Ionen die $C=O$ Valenzschwingungsbande nicht vollständig verschwunden ist. Hiermit wurden bei der Herstellung dieser Zwitterionen im Ionenaustauscher die Protonen durch die Ca^{2+} Ionen nicht vollständig verdrängt, dies im Gegensatz zu den Verhält-

nissen bei allen anderen insbesondere auch bei den Mg^{2+} Ionen. Hiernach scheint die Anwesenheit der Ca^{2+} Ionen die Ausbildung der inneren Wasserstoff-Brücken zu begünstigen.

In Abb. 23 a und b werden das K^+ - bzw. Ca^{2+} -Zwitterion, die entsprechenden Zwitterionen mit zusätzlichem KCl bzw. $CaCl_2$ und mit zusätzlichem HCl Gegenionenpaar verglichen. Diese Gegenüberstellung zeigt besonders deutlich, daß sich bei Anwesenheit von H^+ stets die polarisierbaren inneren Wasserstoff-Brücken bilden. Sehen wir uns nun noch die ionen-abhängigen Veränderungen an der Bande der asymmetrischen Deformationsschwingung der $-NH_3^+$ Gruppe an. Bei den Zwitterionen in Abb. 21a liegt diese beim K^+ und beim Ca^{++} bei 1527 cm^{-1} und verschiebt sich beim H^+ -Zwitterion nach 1544 cm^{-1} . Dies zeigt, daß die $-NH_3^+$ Gruppe beim H^+ -Zwitterion kräftigere Wasserstoff-Brücken mit Wassermolekülen bildet, als bei den anderen Zwitterionen. Dies kann man verstehen, wenn man bedenkt, daß das Feld der negativ geladenen Karboxylgruppen die Verhältnisse an der $-NH_3^+$ Gruppe beeinflußt. Je schwächer dieses Feld ist, um so stärker werden die Wasserstoff-Brücken, die die $-NH_3^+$ Gruppe bildet, sein. Da die Karboxylgruppe durch das Proton stärker abgeschirmt wird, als im Fall der anderen Zwitterionen, versteht man den beobachteten Unterschied.

Ist ein H^+ anwesend, so verändert ein Gegenionenpaar an der Lage dieser Bande nichts, dies zeigt Abb. 21b. Entscheidend ist also die Abschirmung der Karboxylgruppe durch das Proton. Abb. 21c zeigt, daß sich diese Bande in der Reihe Ca^{++} , K^+ und H^+ -Zwitterion mit einem Gegenionenpaar, das dasselbe Kation enthält, nach größeren Wellenzahlen verschiebt. In diesem Fall zeigt sie also bei Anwesenheit von dem Ca^{++} eine noch geringere Verschiebung als bei K^+ . Ca^{2+} schirmt offenbar die Karboxylgruppe besonders schlecht ab.

Abb.23 (s.S.74): Serinphosphorsäure-P-Methylester

- a) oben: { ——— Kalium-Zwitterion
in { ----- H^+ -Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
 H_2O { Kalium-Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
b) oben: { ——— Calcium-Zwitterion
in { ----- H^+ -Zwitterion plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar
 H_2O { Calcium-Zwitterion plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar
unten: Die gleiche Kombination in D_2O
(Formel s.Abschn.III.1.1.)

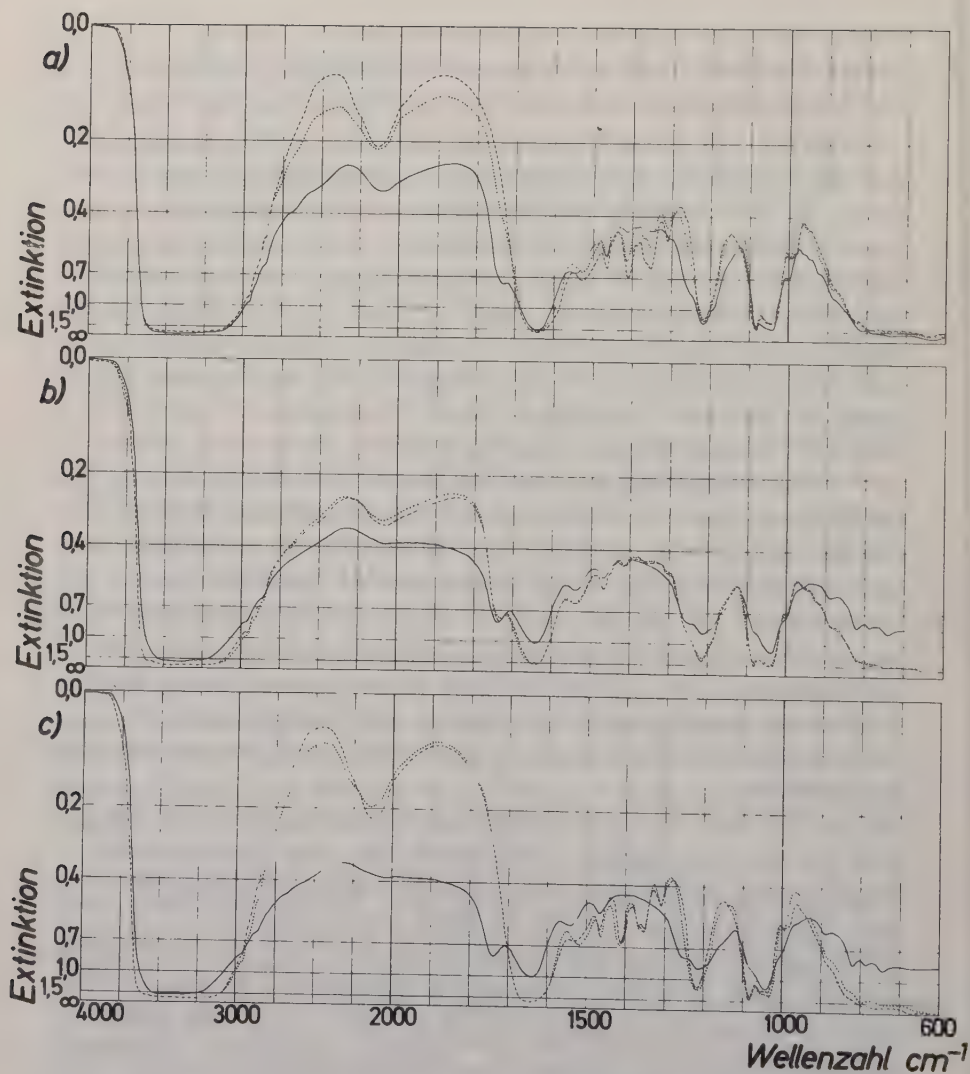


Abb. 21: Serinphosphorsäure-P.Methylester: H_2O -Lösungen

- a) — H^+ -Zwitterion, --- Kalium-Zwitterion
 Calcium-Zwitterion
- b) — 127% H^+
 --- 0% protoniert plus KCl als Gegenionenpaar
 0% protoniert plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar
- c) — 127% H^+
 --- Kalium-Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
 Calcium-Zwitterion plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar
 (Formel s. Abschn. III.1.1.)

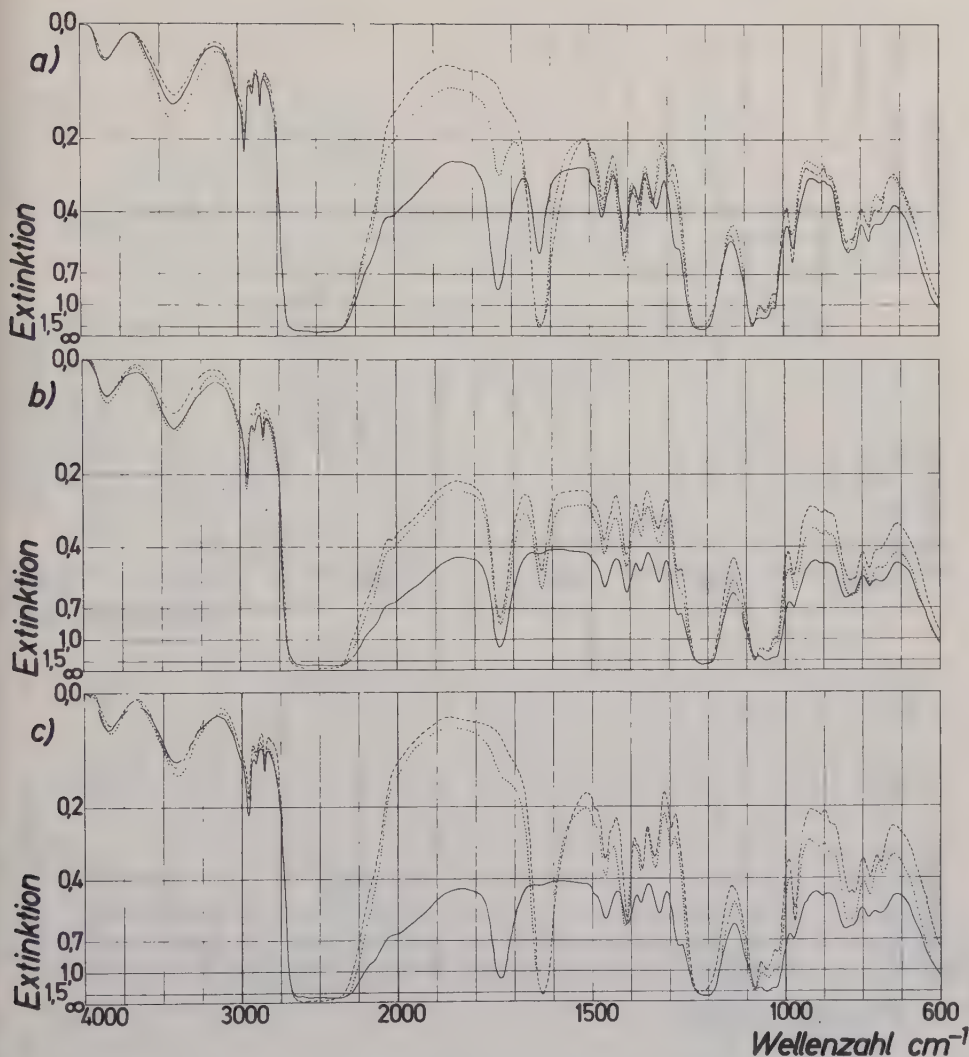


Abb. 22: Serinphosphorsäure-P-Methylester: D_2O -Lösungen.

- a) ——— D^+ -Zwitterion, ----- Kalium-Zwitterion,
 Calcium-Zwitterion
- b) ——— 127% D^+
 ----- 0% deuteriert plus KCl als Gegenionenpaar
 0% deuteriert plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar
- c) ——— 127% D^+
 ----- Kalium-Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
 Calcium-Zwitterion plus $CaCl_2$ als Gegenionenpaar

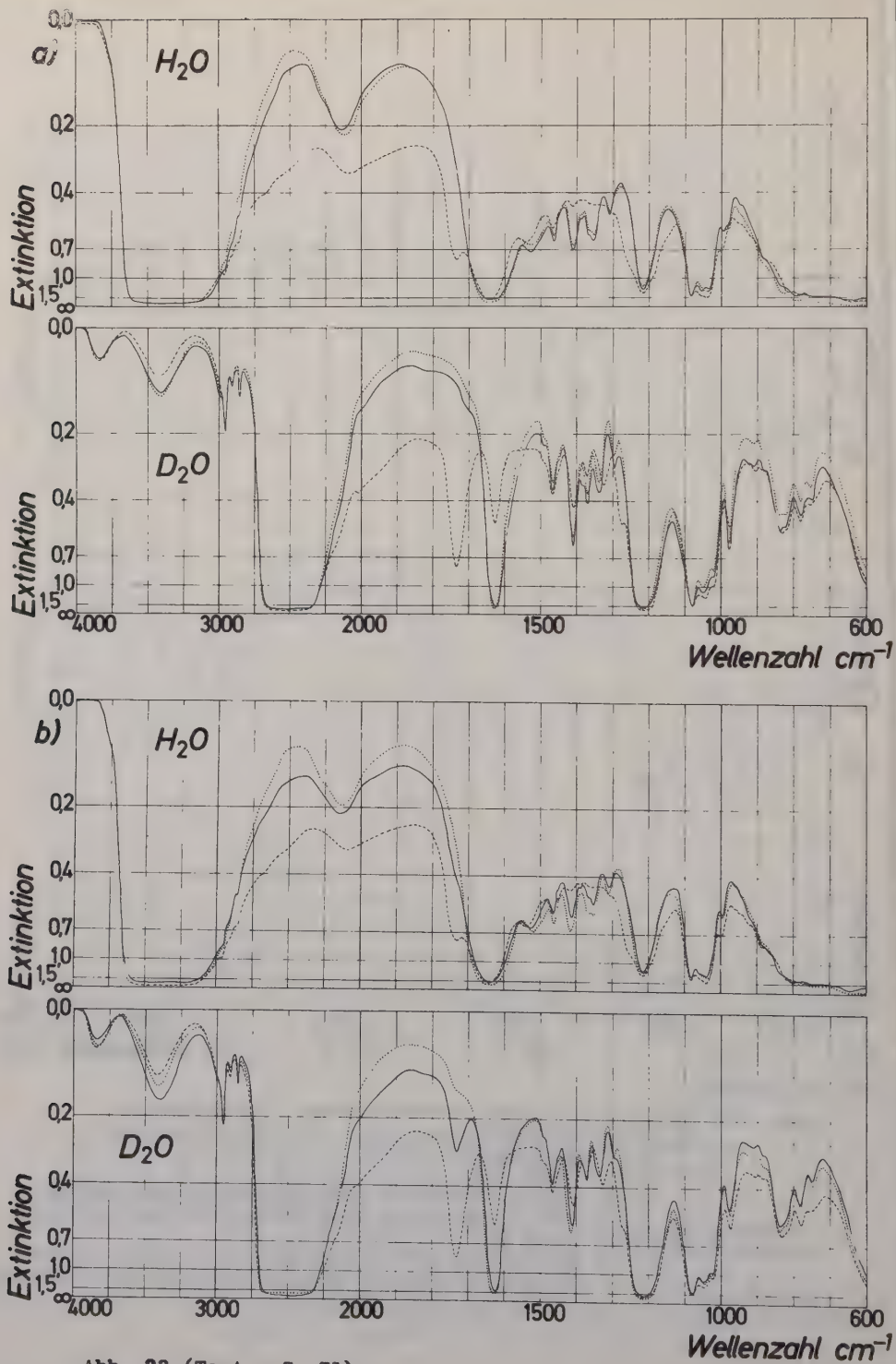


Abb. 23 (Text s.S. 71)

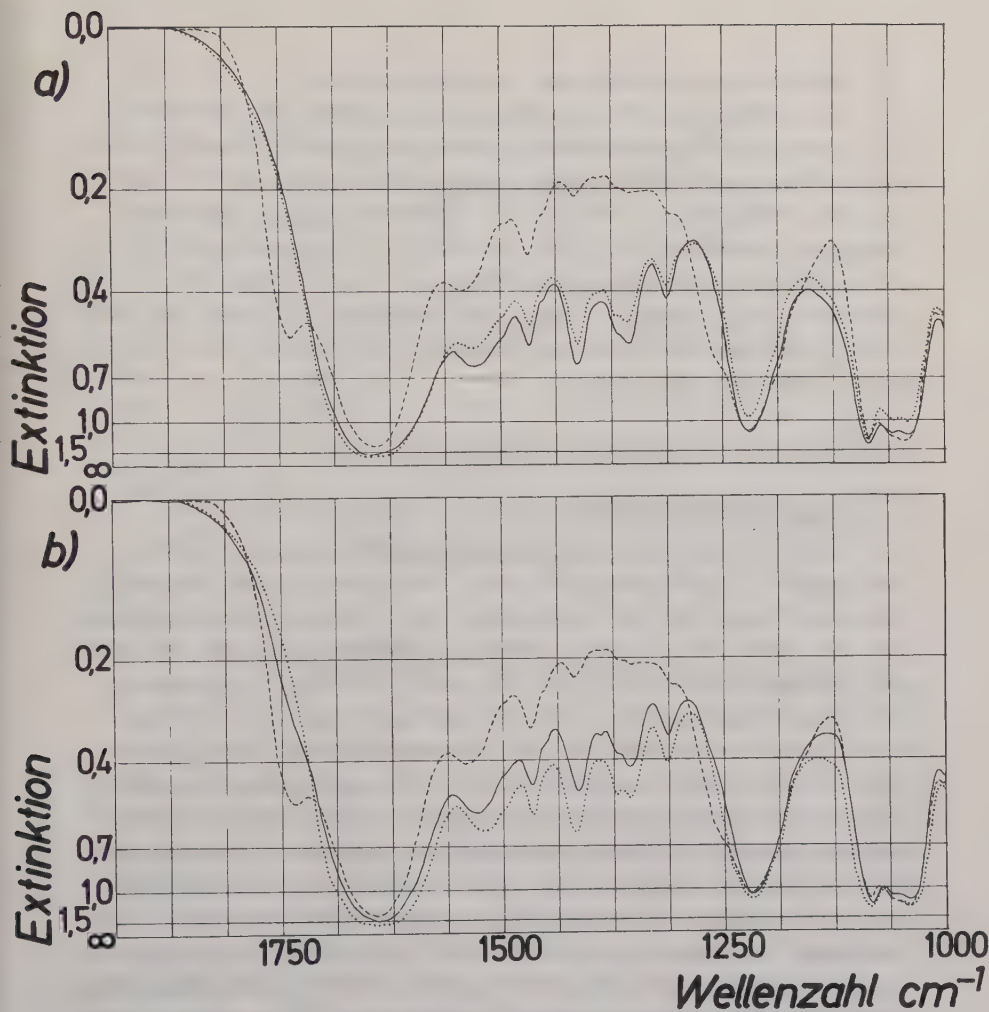


Abb. 24: Serinphosphorsäure-P-Methylester: H_2O -Lösungen
Gedehnter Maßstab, 1900 bis 100% cm^{-1}

- a) ——— Kalium-Zwitterion
 ----- H^+ -Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
 Kalium-Zwitterion plus KCl als Gegenionenpaar
 b) ——— Calcium-Zwitterion
 ----- H^+ -Zwitterion plus CaCl_2 als Gegenionenpaar
 Calcium-Zwitterion plus CaCl_2 als Gegenionenpaar

Zusammenfassend kann man folgendes sagen:

Die Abschirmung der Karboxylgruppe durch die Protonen führt zu einer Elektronenverschiebung im Molekül, dadurch werden die C-N und N-H Bindungen abgeschwächt. Dies hat 1) im Fall der $-\text{NH}_3^+$ Gruppe die bereits erwähnte Bildung stärkerer Wasserstoff-Brücken zu Folge, und 2) eine Verschiebung der C-N Valenzschwingungsbande von 1340 cm^{-1} im K^+ - bzw. Ca^{++} -Zwitterion nach 1328 cm^{-1} im H^+ -Zwitterion. Letzteres ist deutlich in den Spektren der D_2O -Lösungen zu erkennen (Abb. 23a und b, sowie in Abb. 22c).

IV.2. Colaminphosphorsäure-Methylester (CPM)

IV.2.1. Protonierte Serie

Abb. 26 zeigt die Spektren wäßriger Colaminlösungen in Abhängigkeit von der Protonierung. Der Aufbau dieses Moleküls lies mich auch hier die Anwesenheit einer Kontinuumsabsorption bei der protonierten Serie erwarten. Jedoch sollte der Verlauf des Effektes einfacher sein, denn die für kompliziertere Verhältnisse verantwortliche Carboxylgruppe beim Serin ist hier nicht anwesend. Tatsächlich ist der Anstieg der Kontinuumsabsorption weitgehend linear Abb. 25. Mit beginnender Protonierung bilden sich zunächst Wasserstoff-Brücken zwischen den Phosphatgruppen von zwei verschiedenen Molekülen. Hierbei handelt es sich um symmetrische stark polarisierbare Wasserstoff-Brücken, die durch die beiden Grenzstrukturen $(\text{POH}\cdots\text{OP})^-$ und $(\text{PO}\cdots\text{HOP})^-$ darzustellen sind. Dieser Befund wird dadurch bestätigt, daß man das Kontinuum nicht nur im Bereich großer Wellenzahlen, sondern im Gegensatz zu den Verhältnissen beim SPM auch im Bereich mittlerer Wellenzahlen mit gleicher Intensität beobachtet. Eine Bande der $\text{P}=\text{O}$ Valenzschwingung wird nicht beobachtet. Man findet lediglich, daß die Bande der antisymmetrischen Valenzschwingung um 1216 cm^{-1} etwas an Intensität verliert und daß diese sich verbreitert. Auch dies zeigt, daß das Proton sich nicht lange an einem der O-Atome aufhält, sondern daß dieses zwischen den O-Atomen fluktuiert.

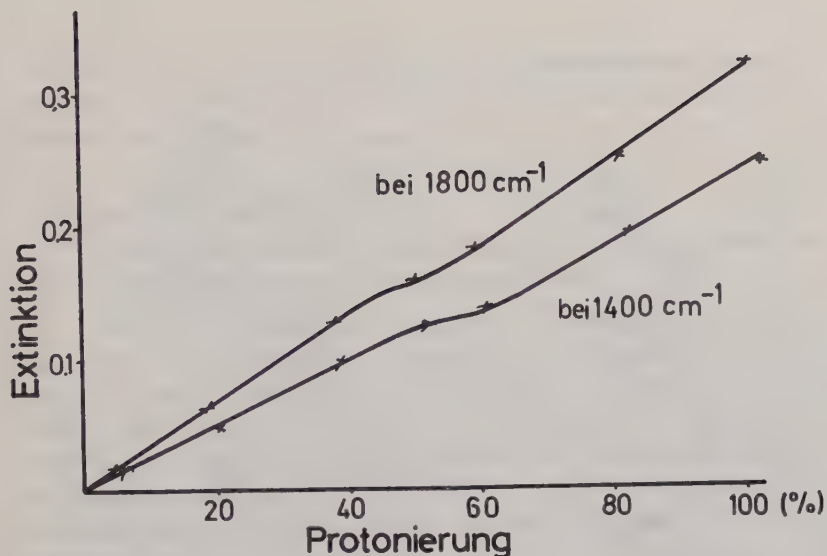


Abb. 25: Colaminphosphorsäure-P-Methylester
Kontinuumsabsorption in Abhängigkeit von der Protonierung

Bei 50% Protonierung zeigt die Kurve in Abb. 25 einen Sattel. Ein derartiger Verlauf des Kontinuums mit der Protonierung wurde an einer großen Zahl von Systemen ausführlich untersucht (86). Er ist charakteristisch für Systeme, bei denen der pKa der Akzeptorgruppen, die die polarisierbaren Wasserstoff-Brücken bilden, relativ klein und damit nicht viel größer ist, als der pKa des Wassers. Tatsächlich ist der pKa der Phosphatgruppe in meinem System sehr niedrig. Der Vergleich mit den Ergebnissen in (86) zeigt, daß sich bei kleinen Protonierungsgraden - wie diskutiert - die polarisierbaren $(\text{POH} \cdots \text{OP})^-$ Brücken bilden. Der Sattel bei 50% Protonierung kommt dadurch zustande, daß für die Ueberschuß-Protonen nun keine Phosphatgruppen für die Bildung der zwischenmolekularen Wasserstoff-Brücken mehr zur Verfügung stehen. Der weitere Anstieg des Kontinuums mit zunehmender Protonierung beruht auf der Bildung von Gruppie-

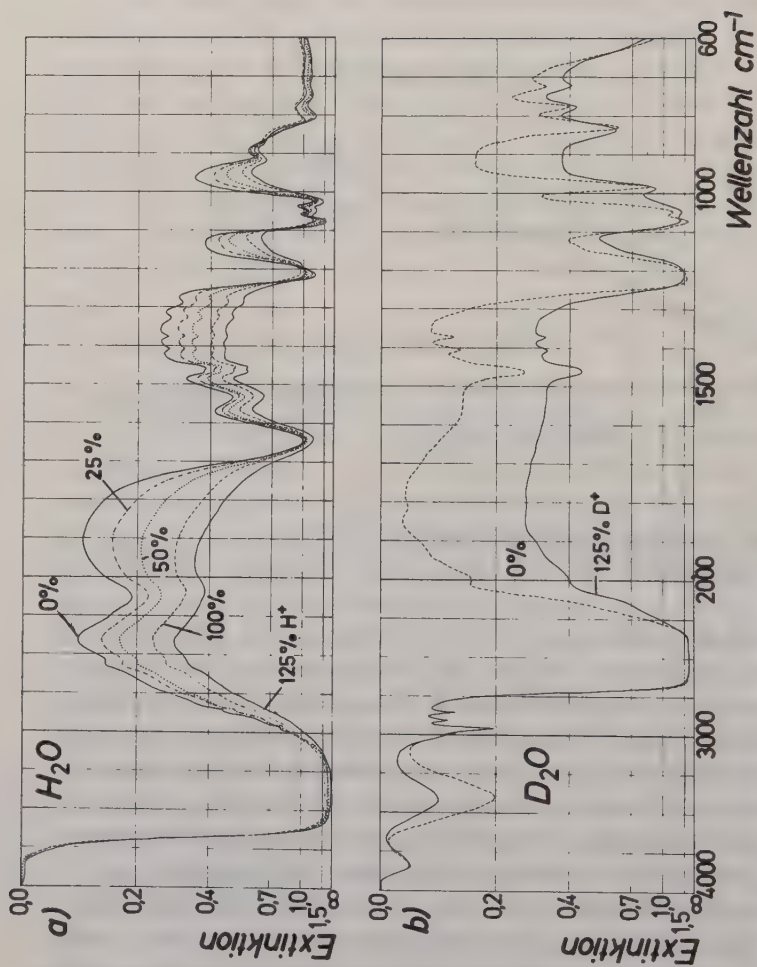


Abb. 26: Colaminphosphorsäure-P-Methylester

a) protonierte Serie in H₂O

b) ----- 0% deuterioniert (Zwitterion) } D₂O
 _____ 125% D⁺

(Formel s. Abschn. III.1.2.)

rungen H_5O_2^+ , die eine extrem leicht polarisierbare Wasserstoff-Brücke enthalten und damit einen großen Beitrag zum Kontinuum liefern.

IV.2.2. Salze von CPM

In Abb. 27 ist oben das Zwitterion mit dem Zwitterion, das als Gegenionenpaar KCl hat, verglichen.

Die Spektren vom Zwitterion mit Gegenionenpaar KCl sind bis auf die asymmetrische NH_3 Deformation bei 1530 cm^{-1} gleich. Wenn das Gegenionenpaar KCl anwesend ist, werden die Cl^- Ionen an die NH_3^+ Gruppe gebunden. Die N-H Bindung wird geschwächt, ihre Bande verschiebt sich hierdurch ein wenig nach kleineren Wellenzahlen, d. h. von 1532 nach 1527 cm^{-1} . Bei Anwesenheit anderer Gegenionenpaare findet man - mit Ausnahme des bereits diskutierten HCl - dasselbe wie beim Gegenionenpaar KCl

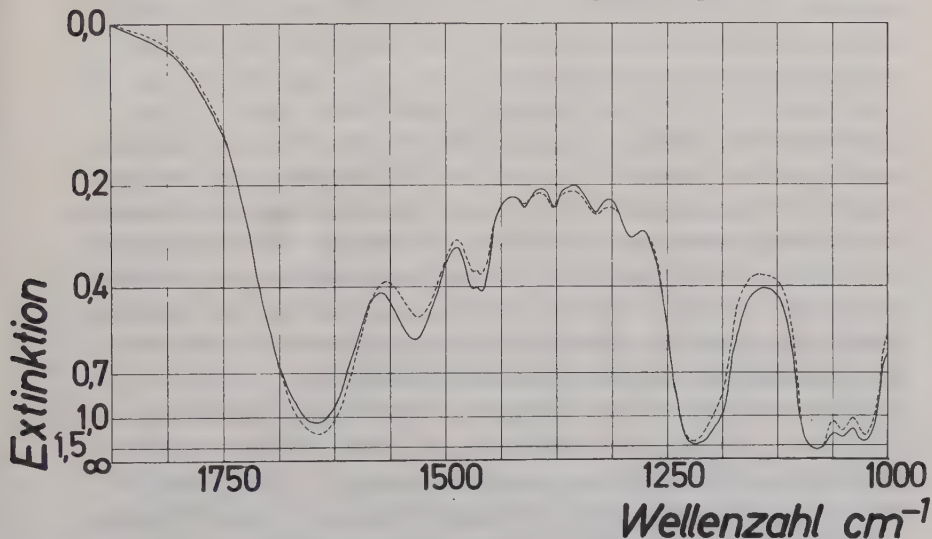


Abb. 27: Colaminphosphorsäure-P-Methylester
Gedehnter Bereich zwischen 1900 und 1000 cm^{-1}
in H_2O -Lösungen
----- Zwitterion
———— Kalium-Salz
(Formel s. Abschn. III.1.2.)

V. Diskussion der Ergebnisse an biologischen Membranen

V.1. Allgemeine Vorstellungen bezüglich der Membranstruktur

Schon um die Jahrhundertwende wurden Phospholipide als Membranbausteine erkannt (87). Andeutungen über die Existenz einer bimolekularen Schicht in den Plasmamembranen machten vor fünfzig Jahren Gortel und Grendel (88). Sie isolierten Phospholipide aus Erythrozytenmembranen und spreiteten diese. Die Menge der Substanz war doppelt so groß, wie sie sie bei einer monomolekularen Schicht erwartet hätten.

Als Ergebnis funktioneller und physikochemischer Untersuchungen an Plasmamembranen stellten 1935 Danielli und Davson (89) ein Membranmodell auf. Viele Jahre später mit der Einführung der Elektronenmikroskopie erschien dieses im Prinzip zunächst richtig. In diesem Modell liegen Proteinmoleküle in zwei parallel zueinander befindlichen Ebenen, senkrecht dazwischen befinden sich Lipidschichten mit den funktionellen Gruppen nach Außen gerichtet (Abb. 28.)

Robertson (90) (91) modifizierte dieses Bild. Die Zahl der Lipidschichten wurde auf zwei begrenzt, die Proteine sollten nicht globulär, sondern vielmehr auf der Lipidschicht gespreitet sein. Er forderte die generelle Gültigkeit dieses Konzepts, das er "unit membrane" nennt. Diese Struktur hat eine Breite von 75 Å. Der Wert variiert jedoch je nach Membranart. Kritiker dieser Struktur (92)-(94) bemängeln, daß bei der Aufstellung dieses Modells strukturelle Daten überbetont, während biochemische weitgehend vernachlässigt wurden.

Neue Befunde stellen die Forderung nach einem allgemeinen Bauprinzip biologischer Membranen in Frage. Sjöstrand (95) zeigte an elektromikroskopischen Aufnahmen mit hoher Auflösung, daß viele Membranen eine granuläre Struktur aufweisen. Diese, als "Subunit" Modell genannte Struktur besteht aus flächenhaften, aggregierten, sphärischen Untereinheiten aus Protein (93), Lipid (96) oder Lipoprotein (92) (93) (97) (98).

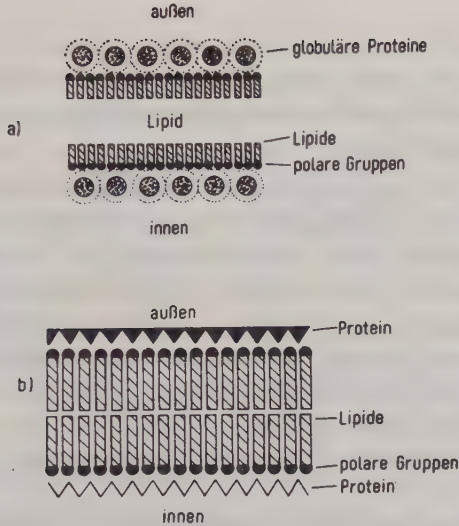


Abb. 28: Membranmodelle a) Membranmodell von Danielli und Davson
b) Membranmodell von Robertson ("unit membrane")

Mittlerweile konnte man jedoch die Entstehung dieser Struktur in manchen Fällen als Folge verschiedener Fixierungsmethoden nachweisen. Ueber mögliche präparationsbedingte strukturelle Veränderungen an den Membranen ist man noch nicht einig. Die Unterschiede zwischen den Membranarten verlieren an Bedeutung, wenn man bedenkt, daß lokale reversible Umwandlungen der lamellaren in die sphärische Konformation denkbar sind (28) (99) (100) (101).

Die Frage nach Konformationsumwandlungen in biologischen Membranen wurde zunehmend Gegenstand von Untersuchungen und Diskussionen. So postulierten mehrere Autoren (102) - (108), daß bei der Erregung der Axonmembranen eine Konformationsumwandlung stattfinden muß. Tasaki et al. (102) (109) - (111) sowie Shrager (112) haben experimentelle Ergebnisse, die eine ionenabhängige Konformationsumwandlung bei der Erregung der Membran nahelegen. Strickholm und Clark (113) untersuchten

den Einfluß von K^+ Konzentration und pH auf den Membranwiderstand. Hsia et al. (114) haben schließlich ionenabhängige Veränderungen an der Proteinkonformation mittels spin label Experimenten nachgewiesen.

Mit Hilfe der IR, ORD und CD Spektroskopie kann die Konformation eines Proteins direkt bestimmt werden. β -Struktur kann von α -Helix und Knäul-Zustand anhand der IR Banden (s. Abschn. V.3.) leicht unterschieden werden, während die ORD und CD Spektroskopie eine Entscheidung zwischen Helix und Knäul-Zustand ermöglichen. Von Wallach und Zahler (115) wurde gezeigt, daß bei Plasmamembranen das Membranprotein größtenteils nicht in β -Struktur vorliegt. Anteile von β -Struktur fanden diese Autoren nur unter extremen Bedingungen, bei pH < 2 .

Ueber ähnliche Ergebnisse mit Erythrozyten und Micrococcus lysodeikticus Membranen berichteten andere Autoren (18) (116) (117). Interessanterweise konnten Graham und Wallach (118) nachweisen, daß mit ATP und Mg^{++} die Konformation von Membranprotein bei Erythrozytenmembranen in antiparallele β -Struktur übergeht.

V.2. Zuordnung der Banden der Spektren und Konformationsabhängigkeit der Amidbanden

Abb. 30 und Abb. 31 zeigen die IR-Spektren von H_2O und D_2O hydratisierten Membranen bei Anwesenheit verschiedener Kationen, ferner die Spektren der getrockneten Proben. Die Isolierung des Rohmaterials, seine Reinigung und die Vorbereitung, der mit verschiedenen Ionen beladenen Filme, wurden in Abschnitt II.3.2. und II.3.2.1. beschrieben.

Miyazawa und Blout (119) untersuchten die Zusammenhänge zwischen Amid I und II Banden und der Kettenkonformation. Sie gehen bei ihren Berechnungen von den ungestörten Schwingungen der einzelnen Peptidgruppen aus und betrachten den Einfluß der be-

nachbarten Gruppen aufeinander mit Hilfe der Störungsrechnung I Ordnung. Darin werden verschiedene Schwingungswechselwirkungen über Wasserstoff-Brücken berücksichtigt. Das wichtigste Ergebnis dieser Rechnung ist, daß die Amid-Banden in Abhängigkeit von der Struktur je nach Konformation in verschiedene Komponenten aufspalten. In der Zwischenzeit wurden von zahlreichen Autoren die Lage der Banden für die verschiedenen Konformationen näher untersucht (120) - (123).

Konformation	Amid I	Amid II
	cm^{-1}	cm^{-1}
Knäul	1658 s ⁺)	1520 s
α -Helix	1650 s	1516 w
β -Struktur } parallel	1648 w 1632 s	1530 s 1550 w
β -Struktur } antiparallel	1685 w 1632 s 1668 vw	1530 s 1510 w 1550 w

Tabelle 4: Bandenzuordnung von Amid I und Amid II von Knäul, α -Helix, β -Struktur

Anhand dieser Angaben und anknüpfend an die Arbeiten (18) (65) (69) (70) (120) - (123) ergibt sich die im folgenden angegebene Zuordnung. Hierbei wurde die Identifizierung der Banden mit austauschbarem Wasserstoff durch D_2O Austausch erleichtert. Den $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_2\text{O}$ Austausch zeigt Abb. 29. In den Tabellen 5 und 6 sind die Lagen der Banden zusammengestellt. Die Abb. 30 bis 32 zeigen die zugehörigen Spektren.

Die Bande bei 1740 cm^{-1} gehört der $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung der Estergruppen in den Phospholipiden bzw. der sauren Karboxylgruppe des Phosphotidylserins an. Sie konnte durch Herauswaschen der Lipide aus den Membranen mittels organischer Lösungsmittel einwandfrei identifiziert werden (18).

⁺) siehe Tabelle 2

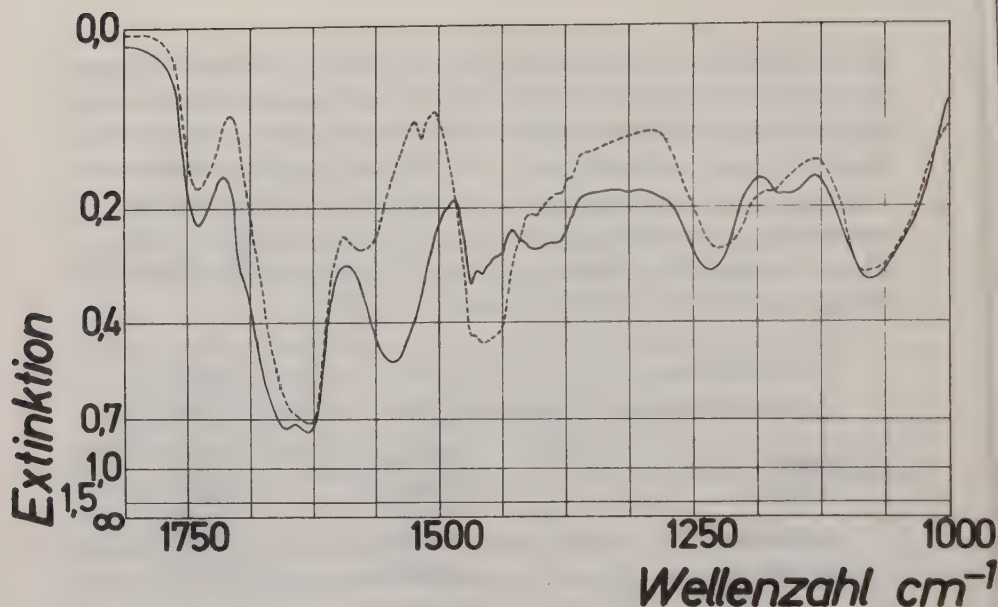


Abb. 29: Spektren erregbarer Membranen: Kalium-Salz
90% relative Luftfeuchtigkeit: — H_2O , ---- D_2O

Die Amid I ($\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung in der Peptidkette) befindet sich bei 1648 cm^{-1} . In den Spektren der D_2O hydratisiertem Membran trifft man bei 1575 cm^{-1} auf die Bande der asymmetrischen Valenzschwingung des Karboxylations (65). Sie muß erst mit D_2O durch Verschiebung der Amid II Bande freigelegt werden. In der K^+ -Form der erregbaren Membranen findet man in diesem Spektralbereich eine Schulter bei 1695 cm^{-1} sowie eine zweite Amid I Bande bei 1630 cm^{-1} . Diese Banden gehören zu Membranprotein in β -Struktur (120) (123).

Die Amid II ($\text{C}-\text{N}$ Valenzschwingung mit einem NH Anteil) in der Peptidkette taucht bei 1544 cm^{-1} auf. Nach dem $\text{H}-\text{D}$ Austausch ist sie bei 1450 cm^{-1} anzutreffen.

in H ₂ O	in D ₂ O	Zuordnung
1740 m ^{†)}	1740 m	C=O Valenz der Phospholipide (18)
1695 sh		Amid I (β -Struktur, anti-paralleler Anteil) (120)-(123)
1648 s	1645 s	Amid I (helikaler Anteil) (120)-(123)
1630 s	1626 s	Amid I (β -Struktur) (120)-(123)
	1575 m	-CO ₂ ⁻ asym.Valenz (65)
1544 s		Amid II (119)
1468 m	1468 m	-CH ₂ - asym.Deformation (68)
1457 w	1457 w	-CH ₃ asym.Deformation (68)
1440 sh	verdeckt	Ringschwingung ?
1405 w	1405 w	-CO ₂ ⁻ sym.Valenz (65)
1370 sh	1370 sh	-CH ₃ sym.Deformation
1310 w	1310 w	Amid III (120)
1232 s	verdeckt	>PO ₂ ⁻ asym.Valenz (69)
1170 w	1170 w	C-O-C asym.Valenz (18)
1077 s	1080 s	>PO ₂ ⁻ sym.Valenz (70)

Tabelle 5: Bandenzuordnung der erregbaren Membranen
(Dimension cm⁻¹)

Die Banden der asymmetrischen Deformationsschwingungen der -CH₂- und -CH₃ Gruppen erscheinen bei 1468 und 1457 cm⁻¹. Im Gebiet um 1400 cm⁻¹ trifft man die symmetrische Valenzschwingungsbande des -CO₂⁻ Ion. Die Schwingungen der Karboxylgruppe des Phosphatidylserins und der asparagin- und glutaminsauren Gruppen liefern hier abwechselnd und je nach den anwesenden Gegenionen unterschiedlich starke Banden.

Die Amid III (NH Deformation mit C-N Valenzschwingungsanteil) erscheint als schwache Bande bei 1310 cm⁻¹. Nach theoretischen Berechnungen von Miyazawa (120) sollte sie bei 1296 cm⁻¹ auftauchen.

^{†)} siehe Tabelle 2

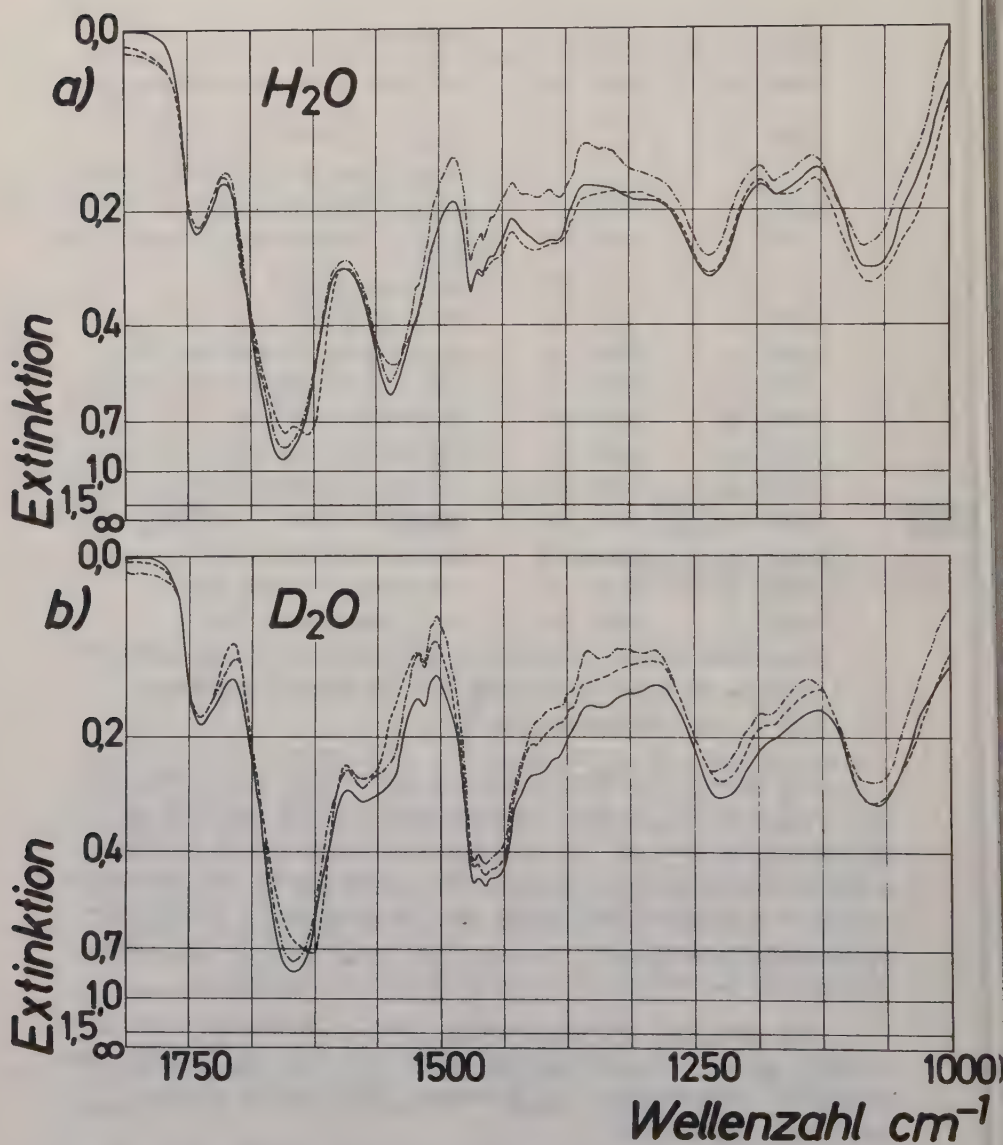


Abb. 30: Spektren erregbarer Membranen
 90% relative Luftfeuchtigkeit
 — Natrium-Salz, ---- Kalium-Salz,
 -.-.- Calcium-Salz : a) H₂O, b) D₂O

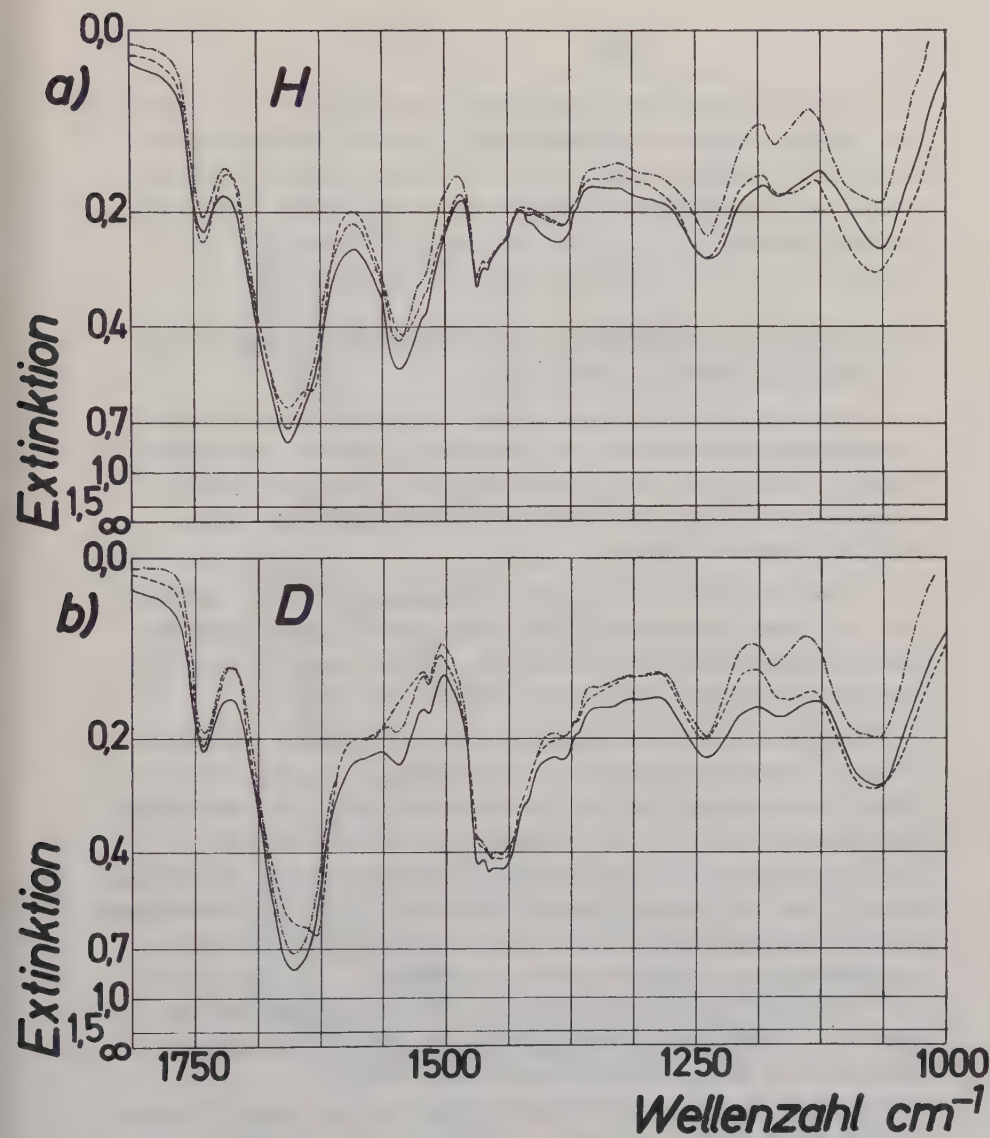


Abb. 31: Spektren erregbarer Membranen
 — Natrium-Salz, ---- Kalium-Salz,
 -.-.- Calcium-Salz: scharf getrocknet
 a) H, b) D

Die >PO_2^- asym. Valenzschwingung befindet sich bei 1232 cm^{-1} (69). Etwas schwächer daneben trifft man die asymmetrische C-O-C Valenzschwingung bei 1170 cm^{-1} . Ihre Identifizierung gelang nach dem gleichen Waschverfahren wie oben. Stark und verbreitert erscheint je nach Gegenion zwischen 1070 und 1080 cm^{-1} die >PO_2^- symmetrische Valenzschwingung (70).

V.3. Nachweis der ioneninduzierten Konformationsumwandlung bei den erregbaren Membranen

Abb. 32 zeigt den Bereich der Amid I und Amid II Bande der erregbaren Membranen bei Anwesenheit der verschiedenen Kationen. Der Einfachheit halber erhalten die verschiedenen Filme den Namen des in ihnen befindlichen Kations, also Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Film.

Zunächst behandle ich die Veränderungen in den Spektren, die von einer ioneninduzierten Konformationsumwandlung her-rühren. Anschließend betrachte ich einige direkten Einwirkungen von Kationen auf bestimmte Gruppen.

In mehreren Abhandlungen (120)-(123) wird die Bande bei 1630 cm^{-1} dem Membranprotein in β -Struktur zugeschrieben. Diese Struktur muß zum Teil antiparallel sein, wie die schwache Schulter bei 1695 cm^{-1} anzeigt. Die Bande um 1648 cm^{-1} ist durch helikales oder geknäultes Membranprotein verursacht. Bewahrt man die Proben längere Zeit bei $+4^\circ\text{C}$ auf, so verschwindet die β -Struktur. Nach ca. 14 Tagen beobachtet man dann schließlich nur noch die Bande um 1648 cm^{-1} . In der Na^+ und Ca^{++} Form der Membranen beobachtet man nur eine Bande bei 1652 cm^{-1} , d. h. das Membranprotein liegt bei Anwesenheit dieser Ionen α -helikal oder ungeordnet vor.

Die Amid II Bande (CN Valenzschwingung mit NH Anteil) findet man in den Spektren der Na^+ und Ca^{++} Form bei 1547 cm^{-1} . In der K^+ -Form trifft man sie bei 1544 cm^{-1} (Abb. 32). Berücksichtigt man die Tabelle 4, dann liegt die Amid II im Fall der K^+ -Form im Hinblick auf den β -Strukturanteil bei einem relativ hohen Wellenzahlenwert. Der Anteil dieser Bande, der von

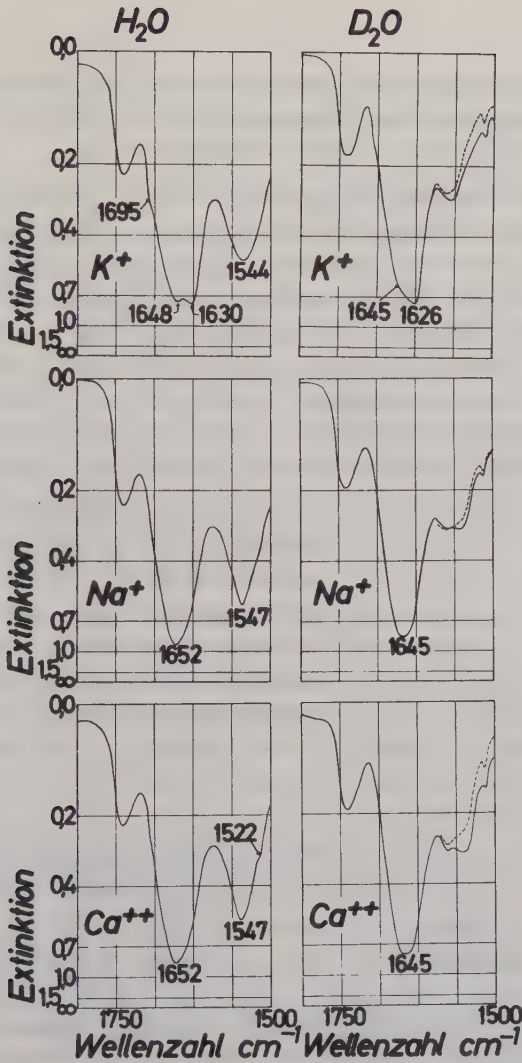
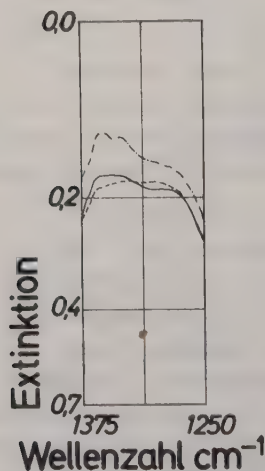


Abb. 32: Spektren erregbarer Membranen
 90% relative Luftfeuchtigkeit; Ausschnitt 1800-1500 cm^{-1}
 oben: Kalium-Salz, mitte: Natrium-Salz,
 unten: Calcium-Salz
 links: H_2O , rechts: D_2O

der β -Struktur herrührt, überlagert sich dem helikalen Anteil, so daß man nur eine Bande sieht, die allerdings nach kleinen Wellenzahlen zu stark verbreitert ist.

In den deuterierten Filmen (Abb. 32) sind die Amid I Banden in Uebereinstimmung mit Angaben in der Literatur (121) etwas nach kleineren Wellenzahlen verschoben. Die schwache Schulter bei 1695 cm^{-1} im Spektrum der K^+ -Form ist verschoben und wird von der Bande der helikalen Anteile verdeckt. Die Amid II Bande verschiebt sich wegen ihres NH Anteils beim Deuterieren von 1545 cm^{-1} nach 1450 cm^{-1} . Das Amid III Gebiet (Abb. 33) weist in der K^+ -Form keine Bande auf, während mit Na^+ und Ca^{++} eine Bande bei 1310 cm^{-1} auftaucht.



Um nun zu entscheiden, ob das Protein der Na^+ - bzw. Ca^{++} -Form helikal oder ungeordnet vorliegt, nahm ich ORD und CD Spektren der Proben auf. Diese zeigten, daß bei Anwesenheit dieser Kationen große Teile des Membranproteins helikal vorliegen.

Abb. 33: Spektren erregbarer Membranen: 90% relative Luftfeuchtigkeit; Ausschnitt $1375 - 1250\text{ cm}^{-1}$
 — Natrium-Salz,
 ---- Kalium-Salz,
 -.-.- Calcium-Salz

Erregbare Membranen mit Tetrodotoxin Zusatz

Tetrodotoxin (TTX) ist das Gift des japanischen Pufferfisches, eine Substanz mit der Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$ und dem Molekulargewicht 319 (bezogen von der Sankyo Kompany, Tokyo). Es enthält eine Guanidino-Gruppe, die wahrscheinlich wesentlich für seine Wirkung ist. Von außen an die Membran gebracht, blockiert es in einer Konzentration von 10^{-7} molar, den sog. "Na-Strom", ohne irgendwelche Nebenwirkung auf den K-Strom. Die Blockierung von innen ist noch stärker. Diese

spezifische Eigenschaft des TTX veranlaßte mich, seine Wirkung auf die erregbare Membranen im IR-Spektrum zu untersuchen.

Im Abschnitt II.3.2.1. wurde die Vorbereitung von zwei Filmen (Probe 1 und 2) erwähnt, deren Darstellung anderes als die der Ionen-Filme verlief.

Ich habe das Membrankonzentrat nur gegen neutralisiertes Wasser dialysiert, um eventuell vorhandene überschüssige Ionen zu entfernen, und gleich danach den Film, wie im Abschn. II.3.1.2. beschrieben, hergestellt. Dieser Film enthielt nur die Ionen, die in der Natur in den Membranen anwesend sind. Er wird im folgenden Film 1 bezeichnet. Das Spektrum einer zweiten Probe, die ich zusätzlich mit 200 mikromolare Tetrodotoxin-Lösung dialysierte, wird mit dem Spektrum vom Film 1 verglichen

Abb. 34 zeigt die Spektren dieser Proben. Das Spektrum der Probe mit TTX unterscheidet sich bezüglich der Amidbanden nicht von dem des Na^+ Films in Abb.32. D. h. bei Anwesenheit von TTX hat das Membranprotein dieselbe Konformation wie bei Anwesenheit der Na^+ Ionen. Einige andere Veränderungen in Spektren durch TTX werden im folgenden noch diskutiert.

Zusammenfassend können wir nun zunächst feststellen:

Bei der K^+ -Form liegen beträchtliche Teile des Membranproteins in mindestens teilweise antiparalleler β -Struktur vor. Demgegenüber findet man bei der Na^+ - und Ca^{2+} -Form und bei Anwesenheit von TTX keine β -Struktur. Das Membranprotein ist bei Anwesenheit von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen recht weitgehend helikal.

Neben den Ionenabhängigen Veränderungen in den Spektren, die man direkt mit der Konformation korrelieren kann, macht man noch einige andere Beobachtungen, die entweder auch von der Konformationsumwandlung herrühren oder auf direkten Wechselwirkungseinflüssen der Kationen auf die funktionellen Gruppen in der Membran beruhen.

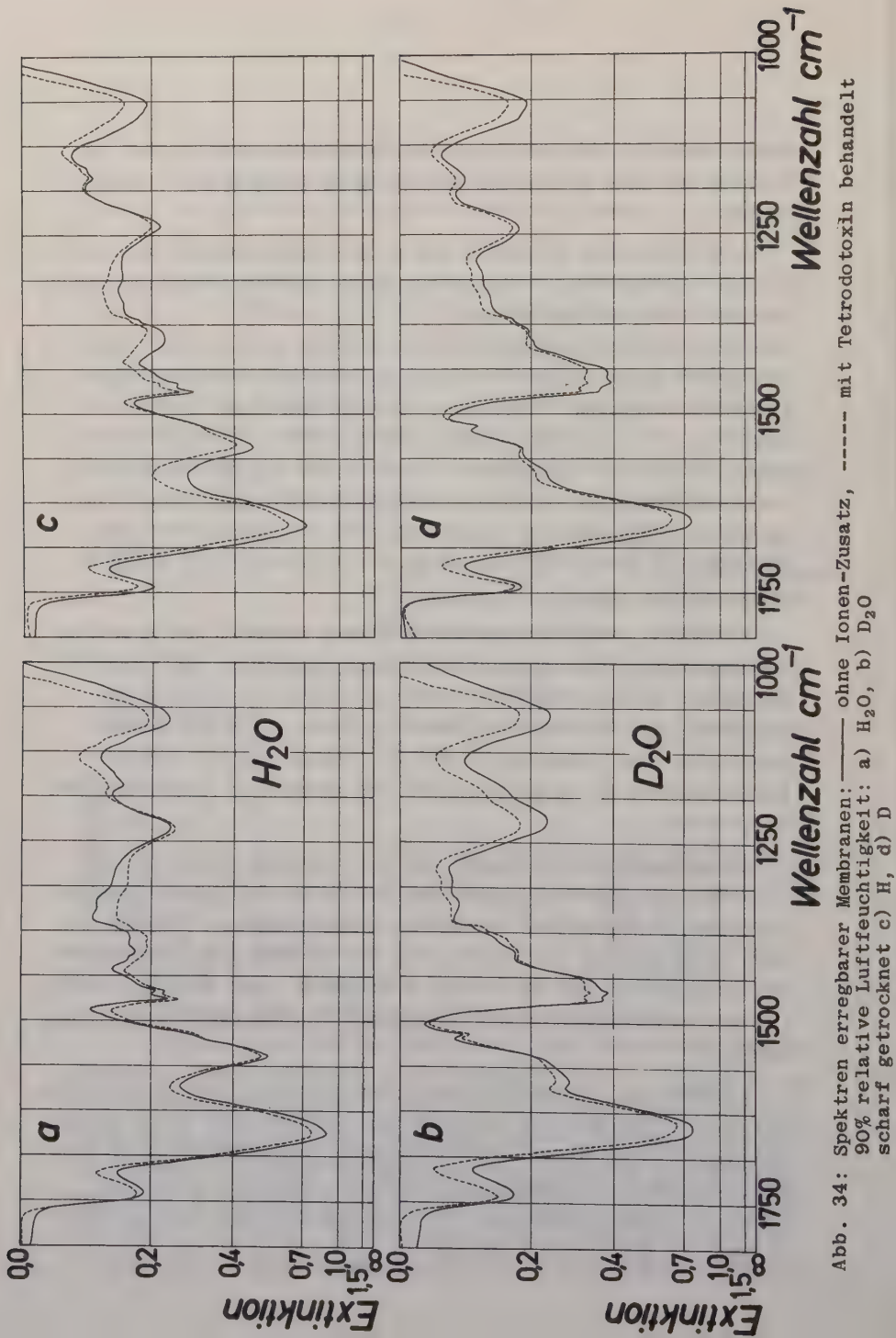


Abb. 34: Spektren erregbarer Membranen: — ohne Ionen-Zusatz, ---- mit Tetrodotoxin behandelt
 90% relative Luftfeuchtigkeit: a) H₂O, b) D₂O
 scharf getrocknet c) H, d) D

Vergleichen wir zunächst den K^+ -Film, der ja die β -Struktur enthält, mit dem Na^+ - und Ca^{2+} -Film der Membran (Abb. 30a). In der Gegend um 1400 cm^{-1} befinden sich die symmetrischen Valenzschwingungsbanden von zwei verschiedenen Karboxylatgruppen. Eine stammt aus dem Phospholipid- und eine aus dem Proteinanteil der Membran, nämlich vom Phosphatidylserin und von den asparagin- bzw. glutaminsauren Gruppen. In der K^+ -Form beobachtet man eine Verbreiterung der Bande bei 1405 cm^{-1} . In der Ca^{++} -Form trifft man sie bei 1402 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1415 cm^{-1} und in der Na^+ -Form bei 1392 cm^{-1} . Ebenfalls verbreitert ist in der K^+ -Form die Bande bei 1440 cm^{-1} (Karboxylat der asparaginsäuren oder glutaminsäuren Gruppen oder Ringschwingungen). In der Na^+ - und Ca^{++} -Form findet man sie bei 1445 cm^{-1} . Die C-O-C Valenzschwingung ist in der K^+ -Form bei 1171 cm^{-1} mit einer Schulter versehen, mit Na^+ und Ca^{++} dagegen nicht.

Der Sachverhalt, daß sich speziell auch die Banden der Karboxylgruppen bei der Konformationsumwandlung ändern, läßt vermuten, daß die Phospholipide von der Konformationsumwandlung in der Membran betroffen sind.

Vergleichen wir nun den Ca^{2+} -Film mit dem Na^+ - und K^+ -Film.

Ca^{2+}	Na^+	K^+	
1415 cm^{-1}	-	-	$\nu_s -C_{\alpha}^{O-}$
Schulter			
1342 cm^{-1}	-	-	
1095 cm^{-1}	-	-	$\nu_{as} C-O-(P)$
Schulter			

Diese Veränderungen dürften auf direktem Ca^{2+} Ionen- einfluß auf die funktionellen Gruppen in der Membran beruhen.

Besonders interessant ist es nun noch, daß man speziell bei der Anwesenheit von TTX eine Veränderung an der symmetrischen Karboxylat-Valenzschwingung beobachtet. Im Spektrum

des Films I (Abb. 34a) erkennt man im Gebiet der symmetrischen Valenzschwingung des Karboxylations eindeutig eine kleine Schulter bei 1412 cm^{-1} und eine Bande bei 1402 cm^{-1} . Nach TTX Zusatz wird eine Zunahme der Bande bei 1412 cm^{-1} beobachtet, die eine Verschiebung der 1402 Bande vortäuscht und sie bei 1397 cm^{-1} erscheinen läßt. In den Spektren der D_2O hydratisierten Proben (Abb. 34b) ist der gleiche Effekt noch einmal zu sehen, man erkennt deutlich die breite Schulter im TTX Spektrum bei 1400 cm^{-1} . In den Spektren der nach H_2O Hydratation getrockneten Probe ist die Differenz noch stärker. Das TTX scheint also mit seiner Guanidino-Gruppe die Karboxylat-Gruppen in den Membranen zu beeinflussen.

V.4. Diskussion der Befunde an den Erythrozytenmembranen

In den Abschnitten II.3. bis II.3.1.3. wurden sämtliche Isolierungs- und Vorbereitungsarbeiten sowie die Aufnahme der Spektren bereits beschrieben.

Die Spektren, der mit Na^+ - und K^+ -Ionen beladenen Filme hydratisiert und deuteriert, naß und trocken, zeigen die Abb. 36 und 37. Als Vertreter der Alkali-Ionen wird ein mit Na^+ -Ionen präparierter Film mit den entsprechenden Ca^{++} - und Mg^{++} -Filmen verglichen (Abb. 38 und 39). Die Na^+ - und K^+ -Filme wurden im Bereich der H_2O -Scherenschwingung mit der halben Schichtdicke aufgenommen; denn diese Filme hydratisierten sich so stark, daß bei der üblichen Schichtdicke dieser Bereich völlig verfinstert war. Das H-D Austauschbeispiel (Abb. 35) erleichtert die Suche nach der Herkunft der Banden.

V.4.1. Filme mit Na^+ - bzw. K^+ -Ionen (Abb. 36a)

Amid-Banden, die Membranprotein in β -Struktur anzeigen, werden bei den Erythrozytenmembranen unter den vorliegenden Bedingungen bei keinem der Gegenionen beobachtet. Die K^+ induzierte β -Struktur ist offensichtlich charakteristisch für die erregbaren Membranen.

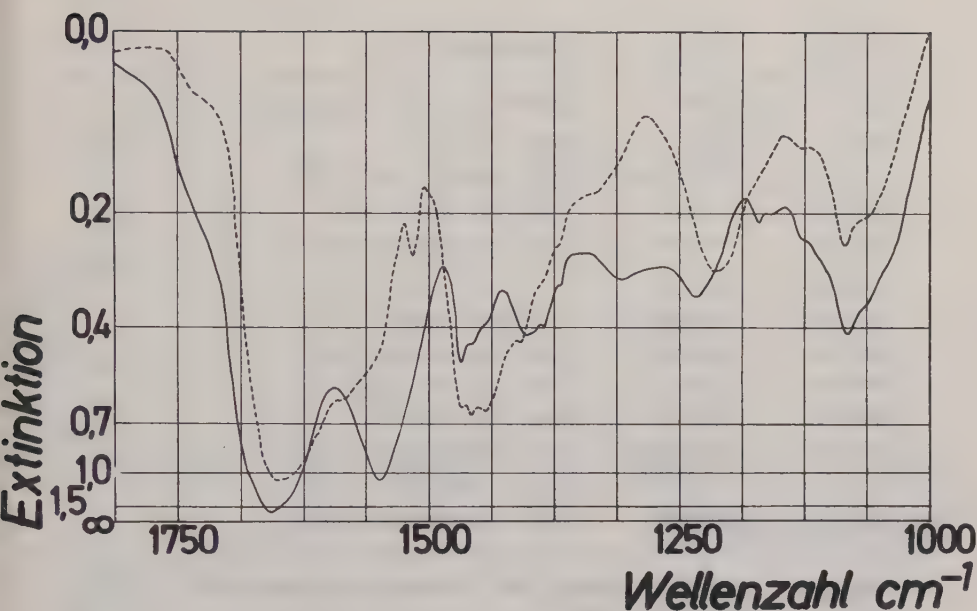


Abb. 35: Spektren der Erythrozytenmembranen
 Kalium-Salz: 90% relative Luftfeuchtigkeit
 — H_2O , ---- D_2O

Im Bereich der symmetrischen Karboxylat-Valenzschwingung bei 1400 cm^{-1} ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Spektren festzustellen. Die Bande ist in dem Spektrum des K^+ -Films etwas verstärkt und verbreitert. Verbreiterungen werden auch an anderen Stellen dieses Spektrums beobachtet, so bei 1440 cm^{-1} und in der Gegend der >PO_2^- sym. Valenzschwingung bei 1065 cm^{-1} . Demgegenüber ist bei 1040 cm^{-1} eine Bande verschwunden. In den Spektren der trockenen Filme beobachtet man ferner (Abb. 36b), daß beim K^+ -Film die Intensität der Bande bei 1385 cm^{-1} stark zugenommen hat.

Die Spektren der deuterierten Filme liefern weitere Informationen (Abb. 37). Ein aus physiologischer Lösung hergestellte Film wird ebenfalls gezeigt.

in H ₂ O	in D ₂ O	Zuordnung
1740 m ⁺)	1740 m	C=O Valenz der Phospholipide (18)
1655 s	1645 s	Amid I (120)
	1582 m	-CO ₂ ⁻ asym.Valenz (65)
1547 s		Amid II (119)
1467 m	1467 m	-CH ₂ - asym.Deformation (68)
1455 w	1455 w	
1440 sh	verdeckt	Ringschwingung ?
1400 m	1400 m	-CO ₂ ⁻ sym.Valenz (65)
1370 sh	1370 sh	-CH ₃ sym.Deformation
1310 w	1310 w	Amid III (120)
1231 m	verdeckt	>PO ₂ ⁻ asym.Valenz (69)
1170 w	1170 w	C-O-C asym.Valenz (18)
1082 s	1085 s	>PO ₂ ⁻ sym.Valenz (70)

Tabelle 6: Bandenzuordnung der Erythrozytenmembranen
(Dimension cm⁻¹)

Als erstes macht sich die große Bande der D₂O Deformations-schwingung bei 1210 cm⁻¹ bemerkbar. Sie ist in den Spektren des Na⁺- und physiologischen Films sehr intensiv und beherrscht das Gebiet zwischen 1300 und 1150 cm⁻¹. Im Spektrum des K⁺-Films dagegen ist sie relativ schwach und läßt sogar die symmetrische C-O-C Valenzschwingung als Schulter bei 1177 cm⁻¹ erscheinen. Berücksichtigt man alle Effekte, so ist folgendes zu sagen: Die Verbreiterung der Karboxylat-Banden und der Unterschied in der Hydratation zeigen, daß K⁺-Ionen einen etwas anderen Einfluß auf die Membran nehmen als Na⁺-Ionen. Zu einer Konformationsänderung des Membranproteins kommt es jedoch nicht.

⁺) Siehe Tabelle 2

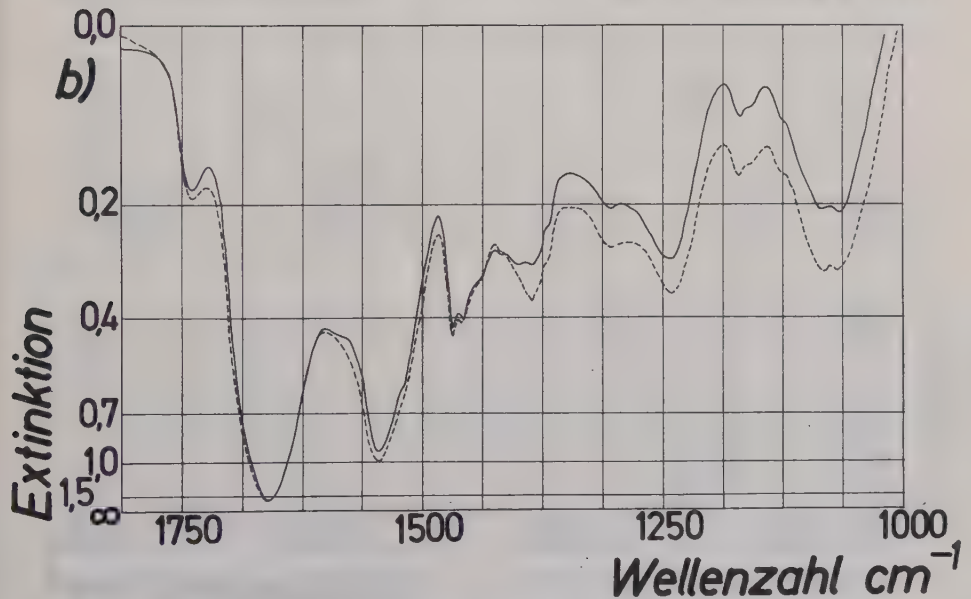
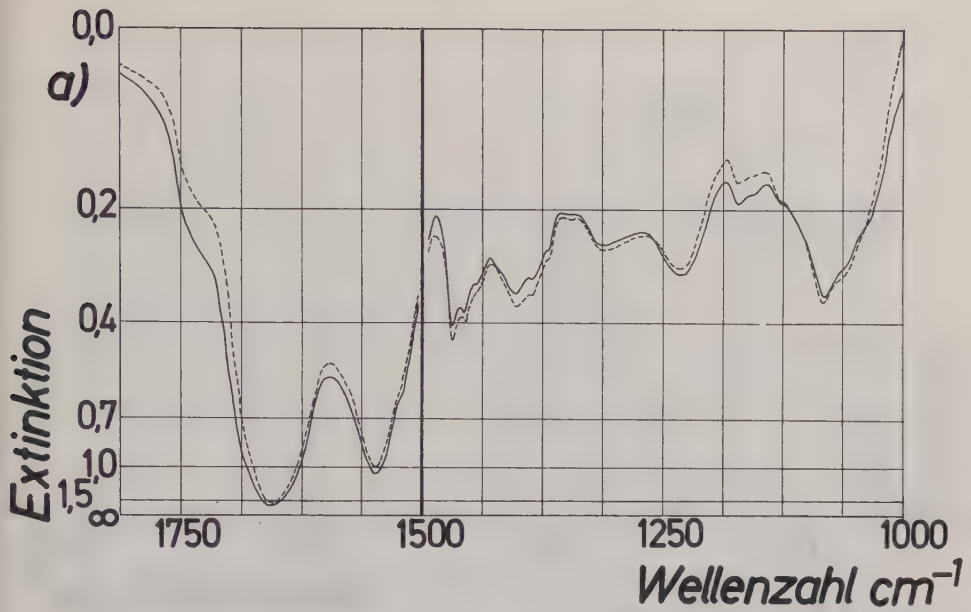


Abb. 36: Spektren der Erythrozytenmembranen

— Natrium-Salz, ---- Kalium-Salz

a) 90% relative Luftfeuchtigkeit (H_2O)

b) getrocknet (H)

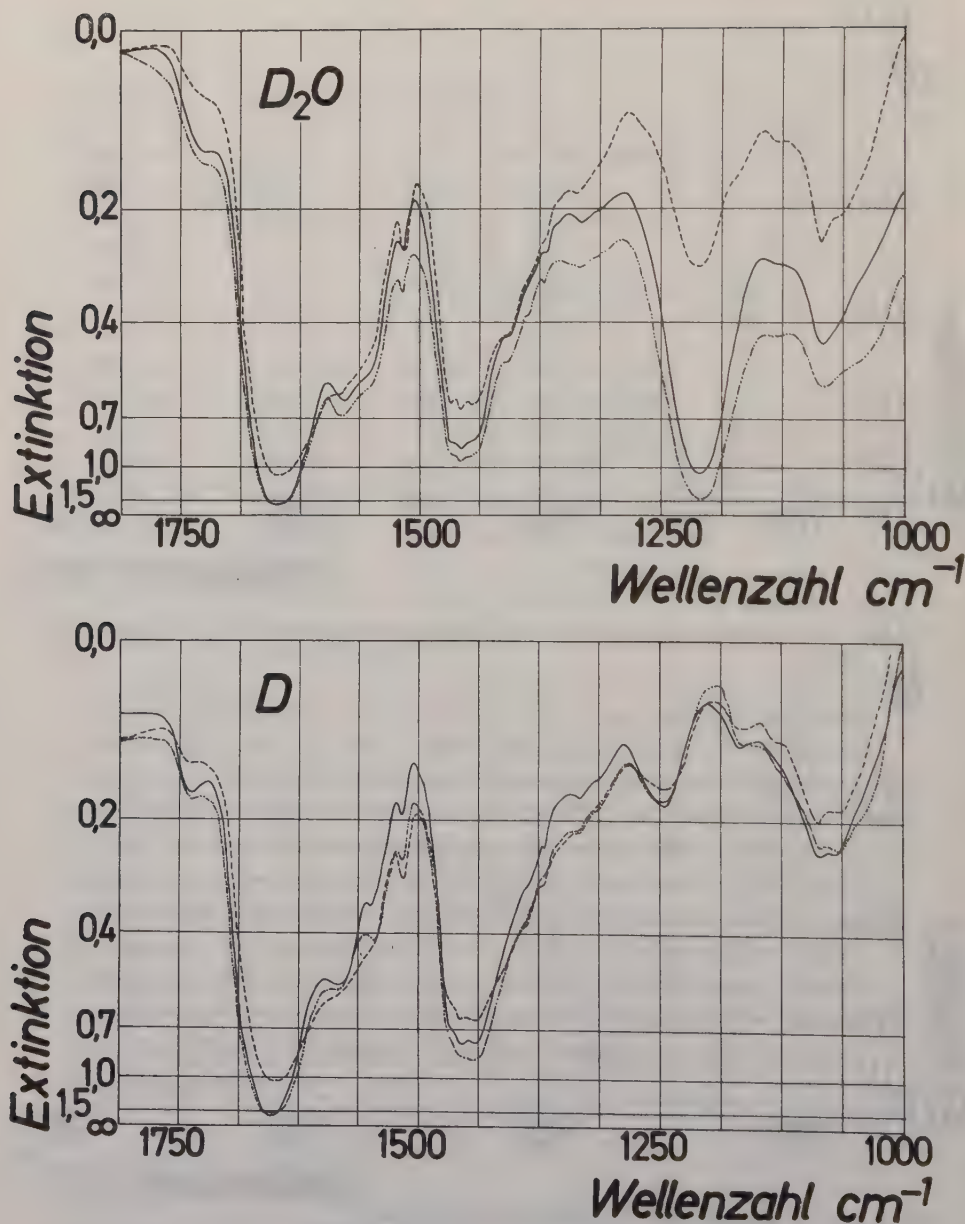


Abb. 37: Spektren der Erythrozytenmembranen. — Natrium-Salz, ---- Kalium-Salz, -.-.-. physiol. Ionen (s. Seite 37)
oben: 90% relative Luftfeuchtigkeit (D_2O)
unten: getrocknet (D)

V.4.2. Filme mit Ca^{++} - bzw. Mg^{++} -Ionen

Die Spektren der Filme mit Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen unterscheiden sich ebenfalls an einigen Banden (Abb. 38).

Bei 1422 cm^{-1} ist im Ca^{++} -Film eine schwache Bande neben den $-\text{CH}_2-$ und $-\text{CH}_3$ Deformationsschwingungen zu sehen. Das Spektrum des Mg^{++} -Films weist an dieser Stelle eine Verbreiterung auf, die Bande macht sich als Schulter bemerkbar.

Verschoben sind die asymmetrische PO_2^- sowie die C-O-(P) Valenzschwingungen bei 1230 bzw. 1100 cm^{-1} . Im Spektrum des Mg^{++} -Films tauchen sie bei höheren Wellenzahlen auf.

	Mg^{++}	Ca^{++}	
PO_2^-	1244	1239	cm^{-1}
C-O-(P)	1109	1100	cm^{-1}

In den Spektren der getrockneten Probe sind weitere Unterschiede zu erkennen (Abb. 39a). Zunächst ist die Verschiebung der asymmetrischen PO_2^- Valenzschwingung im Mg^{++} -Film noch deutlicher (Mg^{++} 1246 cm^{-1} , Ca^{++} 1239 cm^{-1}). Im Gegensatz zu Ca^{++} ist diese Bande mit Mg^{++} -Ionen stark verbreitert und verdeckt das Gebiet bis zur Amid III Bande. Die Verschiebung der C-O-(P) Valenzschwingung ist in den Spektren der trockenen Filme leichter zu erkennen. Während sie mit Ca^{++} als Schulter bei 1106 cm^{-1} erscheint, taucht sie mit Mg^{++} als Bande bei 1125 cm^{-1} auf (Abb. 39a).

Im Spektrum, der nach D_2O Hydratation getrockneten Proben (Abb. 39b) befindet sich bei 1585 cm^{-1} die asymmetrische $-\text{CO}_2^-$ Valenzschwingung. Sie ist mit Ca^{++} - im Gegensatz zu Mg^{++} - so stark verbreitert, daß sie das freie Gebiet der nach dem $\text{H} \rightarrow \text{D}$

Austausch weitgehend verschwundenen Amid II Bande zum Teil verdeckt.

In den Spektren der deuterierten Proben erscheint in der Amid III Gegend in beiden Filmen eine neue Bande, ihre Lage scheint ein wenig von den anwesenden Ionen abhängig zu sein. Im Spektrum des Mg^{++} -Films taucht sie bei 1330 cm^{-1} und mit Ca^{++} bei 1335 cm^{-1} auf (Abb. 38b). Im trockenen Zustand ist die Verschiebung ein wenig kleiner.

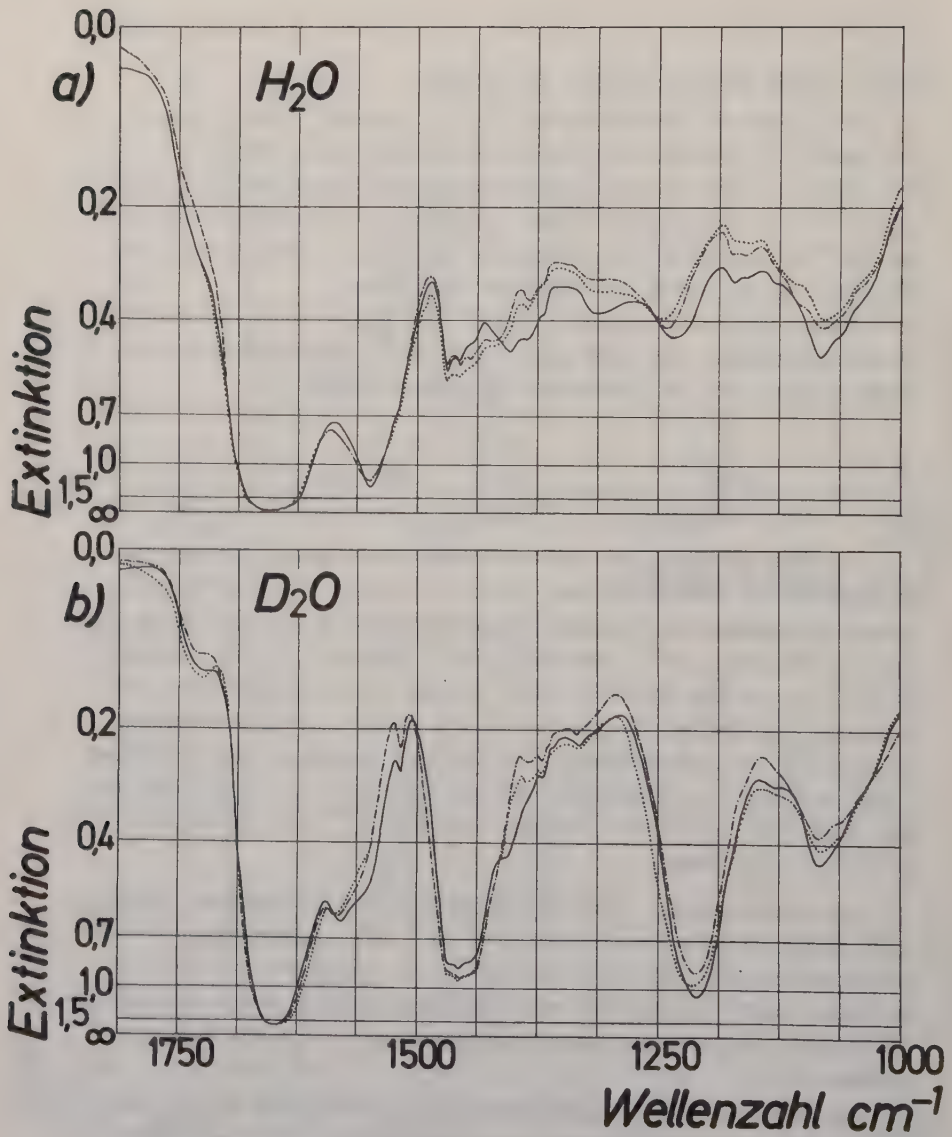


Abb. 38: Spektren der Erythrozytenmembranen: — Natrium-Salz
 - - - Calcium-Salz, Magnesium-Salz
 90% relative Luftfeuchtigkeit
 a) H_2O , b) D_2O

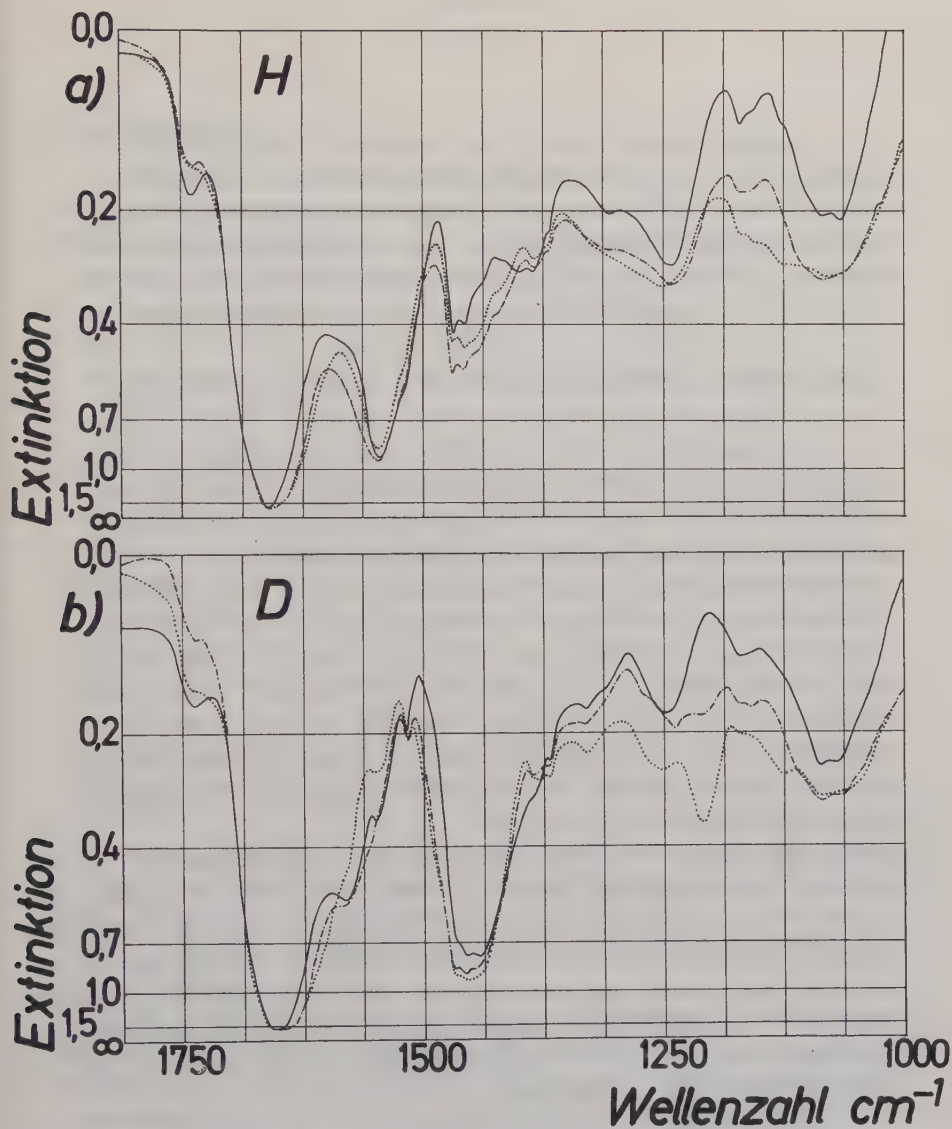


Abb. 39: Spektren der Erythrozytenmembranen: — Natrium-Salz, - - - - Calcium-Salz, Magnesium-Salz
scharf getrocknet: a) H, b) D

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild. Die vorhandenen Verschiebungen lassen unterschiedliche Einwirkungen der Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen auf die Membranen erkennen. Da die Veränderungen zum großen Teil an Stellen auftreten, wo funktionelle Gruppen der Phospholipide ihre Banden haben, muß man eine Wechselwirkung der Ionen mit diesen Gruppen annehmen.

V.4.3. Vergleich der Alkali-Ionen mit den Erdalkali-Ionen-Filmen

Am auffälligsten sind die Unterschiede zwischen Na^+ und K^+ einerseits und Ca^{2+} und Mg^{2+} andererseits, in der Gegend um 1400 cm^{-1} (Abb. 38a). Die symmetrische Karboxylat-Valenzschwingung erscheint im Na^+ -Spektrum bei 1402 cm^{-1} . Mit den zweiwertigen Ionen verschiebt sie sich nach 1422 cm^{-1} . In den Spektren der deuterierten Filme ist dieser Unterschied ebenfalls sehr deutlich (Abb. 38b). Die Bande bei 1440 cm^{-1} ist in allen Spektren zu sehen, mit Ca^{++} und Mg^{++} jedoch stark verbreitert. Deutlich zugenommen hat die Amid III Bande im Na^+ -Spektrum bei 1310 cm^{-1} . Die Ca^{++} - und Mg^{++} -Proben weisen eine flache zu größeren Wellenzahlen verschobene und verbreiterte Bande auf.

Die asymmetrische $-\text{CO}_2^-$ Valenzschwingung (nur nach dem H-D Austausch zu sehen) bei 1580 cm^{-1} (Abb. 38b), sowie die asymmetrische Valenzschwingung der $>\text{PO}_2^-$ Gruppe bei 1239 cm^{-1} , sind bei den Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Proben etwas nach größeren Wellenzahlen verschoben (Abb. 38a). Die symmetrische PO_2^- Valenzschwingung bei 1077 cm^{-1} verschiebt sich dagegen nach kleineren Wellenzahlen. Außerdem wird die C-O-(P)-Valenzschwingung (1100 cm^{-1}) bei Ca^{2+} und Mg^{2+} wesentlich intensiver.

Die Verschiebungen der Schwingungen der $-\text{CO}_2^-$ bzw. $>\text{PO}_2^-$ Gruppen durch die Erdalkalitionen, weisen darauf hin, daß diese Ionen kräftiger mit diesen Gruppen wechselwirken, als die Alkalitionen.

Zusammenfassung

Es wurden der Serinphosphorsäure-P-Methylester (SPM) sowie der Colaminphosphorsäure-P-Methylester (CPM) als Modellsubstanzen für das Phosphatidylserin bzw. Phosphatidyläthanolamin hergestellt. Die IR-Spektren wäßriger Lösungen werden in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern aufgenommen.

Weiterhin wurden erregbare und Erythrozytenmembranen aus Rattenhirn bzw. Rinderblut isoliert und in Anwesenheit von Na^+ , K^+ , Ca^{++} und Mg^{++} Ionen IR-spektroskopisch untersucht.

Aufgrund seiner Struktur enthält das SPM Molekül in H_2O gelöst, eine innermolekulare, unsymmetrische Wasserstoff-Brücke.

Die schrittweise Neutralisation der Protonen dieser Brücke verursacht, je nach Deprotonierungsgrad, die Bildung von Wasserstoff-Brücken unterschiedlicher Natur. Mit beginnender Neutralisation nimmt die Anzahl der unsymmetrisch stark polarisierbarer Wasserstoff-Brücken ab. Dies zeigt die Abnahme der Extinktion eines Kontinuums an. Bei 50% nimmt das Kontinuum leicht zu, d. h. es bilden sich Wasserstoff-Brücken, die einen größeren Beitrag im Kontinuum liefern, als die bereits vorhandenen unsymmetrischen Brücken. Es handelt sich hier um die Bildung stark polarisierbarer, symmetrischer, zwischenmolekularer Wasserstoff-Brücken. Ueber 50% Deprotonierung nimmt das Kontinuum wieder linear mit der Deprotonierung ab. Die Untersuchungen mit zusätzlichen Gegenionenpaaren zeigten, daß sich das Proton durch kein Ion aus der innermolekularen Wasserstoff-Brücke verdrängen läßt.

Bei der Untersuchung der biologischen Membranen ging es darum, erstens geeignetes Material, d. h. myelinfreie Axon zu isolieren, zweitens möglichst die natürliche Beschaffenheit der Membranen während der Messung aufrecht zu erhalten und drittens, eventuell vorhandene ionenabhängige Konformationsumwandlungen nachzuweisen. Axonmembran konnte aus Rattenhirn nach einem geeigneten Verfahren erhalten werden. Mittels einer neuen Methode wurden Filme, ohne daß die natürlichen Verhältnisse durch Trocknung gestört werden, hergestellt.

In den erregbaren Membranen konnte bei Anwesenheit von K^+ -Ionen nachgewiesen werden, daß große Teile der Proteine in β -Konformation vorliegen. Demgegenüber beobachtet man in Gegenwart von Na^+ und Ca^{++} Ionen keine β -Konformation. ORD und CD Untersuchungen zeigten, daß bei Anwesenheit dieser Ionen die Proteine weitgehend helikal vorliegen. Unter gleichen Bedingungen wurde bei den Erythrozytenmembranen keine Konformationsänderung beobachtet.

Das Vorliegen der β -Struktur zeigt, daß Ionen spezifische Konformationen von Proteinen der Axonmembran verursachen können. Andererseits wurde schon häufig die Vermutung ausgesprochen, daß der Aktionszyklus erregbarer Membranen in einer zeitlichen Folge verschiedener Konformationszustände besteht. Hiernach dürfte der Ioneneinfluß auf die Konformation von Membranprotein bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle spielen.

Literatur

- (1) H.Debuch: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)
- (2) H.Wagner: Fette, Seifen, Anstrichm. 62, 1115 (1960)
- (3) H.Wagner, L.Hörhammer und P.Wolff: Biochem.Z. 334, 175 (1961)
- (4) J.Folch: J.Biol.Chem. 146, 35 (1942)
- (5) E.Hecker: Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1955
- (6) E.Hecker: Chemie-Ing.Technik 25, 505 (1953)
- (7) E.Klenk und H.Debuch: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 299, 66 (1955)
- (8) D.J.Hanahan, M.B.Turner und M.E.Jayko: J.Biol.Chem. 192, 623 (1951)
- (9) C.H.Lea, D.N.Rhodes und R.D.Stoll: Biochem.J. 60, 353 (1955)
- (10) D.N.Rhodes und C.H.Lea: Biochem.J. 65, 526 (1957)
- (11) G.B.Philips: Biochim.Biophys.Acta: 29, 594 (1958)
- (12) G.J.Nelson: J.Lipids Res. 3, 71 (1962)
- (13) G.Richter: Dissertation Universität München 1958
- (14) L.Hörhammer, H.Wagner und G.Richter: Biochem.Z. 331, 155 (1959)
- (15) H.P.Frank: Dissertation Universität München 1967
- (16) B.Sansoni, W.Kracke: Z.f.analyt.Chem. 243, 209 (1968)
- (17) D.Chapman, P.Byrne und G.G.Shipley: Proc.Roy.Soc. 290, 166 (1966)
- (18) D.F.H.Wallach und P.H.Zahler: Biochim.Biophys.Acta 150, 186 (1968)
- (19) A.E.Skoulios: Thesis, University of Strasbourg 1959
- (20) V.Luzzati, A.Tardien und T.Krzywicki: Nature London 217, 1028 (1968a)
- (21) V.Luzzati, P.H.Spegt: Nature London 215, 701 (1967)
- (22) P.A.Spegt, A.E.Skoulios: Acta crystallogr. 16, 301 (1963)
- (23) P.A.Spegt, A.E.Skoulios: Acta crystallogr. 17, 198 (1964)
- (24) P.A.Spegt, A.E.Skoulios: Acta crystallogr. 21, 892 (1966)

- (25) A.E.Skoulios und V.Luzzati: Acta crystallogr. 14, 278 (1961)
- (26) F.Husson, H.Mustacchi und V.Luzzati: Acta crystallogr. 13, 668 (1966)
- (27) V.Luzzati, T.Krzywicki und A.Tardien: Nature London (in press 1968b)
- (28) V.Luzzati und F.Husson: J.Cell Biol. 12, 207 (1962)
- (29) G.H.de Haas, F.J.M.Daemen und L.L.M.van Deenen: Nature 196, 68 (1962)
- (30) P.Dauvillier, G.H.de Haas, L.L.M.van Deenen und J.Raulin: Comp.Rend. 259, 4865 (1969)
- (31) P.R.Bird, G.H.de Haas, C.H.T.Heemskerk und L.L.M.van Deenen: Biochim.Biophys.Acta 98, 566 (1965)
- (32) H.van den Bosch, N.M.Postema, G.H.de Haas und L.L.M.van Deenen: Biochim.Biophys.Acta 98, 657 (1965)
- (33) L.L.M.van Deenen, G.H.de Haas: Biochim.Biophys.Acta 70, 211 (1963)
- (34) G.L.Scherphof und L.L.M.van Deenen: Biochim.Biophys.Acta 98, 204 (1965)
- (35) G.R.Rossi, L.Satorelli, L.Tato, L.Baretta und N.Silispani: Biochim.Biophys.Acta 98, 207 (1965)
- (36) E.A.Marples und R.H.S.Thompson: Biochem.J. 74, 123 (1960)
- (37) B.Shapiro: Biochem.J. 53, 663 (1953)
- (38) R.M.C.Dawson: Biochem.J. 64, 192 (1956)
- (39) B.Epstein und B.Shapiro: Biochem.J. 71, 615 (1959)
- (40) J.J.Gallai-Hatchard und R.H.S.Thompson: Biochim.Biophys. Acta 98, 128 (1965)
- (41) J.Stephen: Biochem.J. 80, 578 (1961)
- (42) A.W.Phillips und I.Batty: Nature 198, 1200 (1963)
- (43) M.W.Stein und G.F.J.Logan: Bacteriol. 85, 369 (1963)
- (44) H.M.Doery, B.J.Magnuson, I.M.Cheyne und J.Gulasekharan: Nature 198, 1019 (1963)
- (45) H.Ikezawa, A.Yamamoto und R.Murata: Biochem.J. 56, 480 (1964)
- (46) F.M.Davidson und C.Long: Biochem.J. 69, 458 (1958)

- (47) L.L.M.van Deenen und G.H.de Haas: Ann.Rev.Biochem. 35, 157 (1966)
- (48) H.N.Christensen: J.biol.Chem. 135, 399 (1940)
- (49) I.R.Hunter, R.L.Roberts und E.B.Kester: J.Amer.chem. Soc. 70, 3244 (1948)
- (50) E.Baer: J.Amer.chem.Soc. 74, 152 (1952)
- (51) R.Hirt und R.Berchtold: Helv.chim.Acta 40, 1928 (1957)
- (52) I.Barzilay und Y.Lapidot: Chem.Phys.Lipids 3, 280 (1969)
- (53) R.L.Baylis, T.H.Bevan und T.Malin: J.chem.Soc. 1958, 2962
- (54) E.Baer, D.Buchnea und H.C.Stanger: J.Biol.Chem. 1958, 2166
- (55) T.H.Bevan, T.Malkin und J.M.Tiplady: J.chem.Soc. 1957, 3086
- (56) I.Kampschulte-Scheuing: Dissertation Universität München 1969
- (57) K.P.Hofmann: Dissertation Universität München in Vorbereitung
- (58) S.T.Burger, T.Fujii und D.J.Hanahan: Biochem. 7, 3682 (1968)
- (59) K.P.Hofmann und G.Zundel: Rev.Sci.Instr. 42, 1726 (1971)
- (60) G.Zundel, A.Murr und G.M.Schwab: Z.Naturforschg. 17a, 1027 (1962)
- (61) R.H.Stokes und R.A.Robinson: Ind.Eng.Chem. 41, 2013 (1949)
- (62) N.Lemkey-Johnston und H.Dekirmenjian: Exp.Brain Res. 11, 392 (1970)
- (63) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Randall: J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
- (64) G.L.Ellman, K.D.Courtney, V.Andres jr. und R.M.Featherstone: Biochem.Pharmacol. 7, 88 (1961)
- (65) L.J.Bellamy: Ultrarot-Spektrum und chem.Konstitution, Steinkopf Verlag, Darmstadt 1966
- (66) R.J.Hopper: Inorg.Chem. 3, 1568 (1964)
- (67) C.Duval, H.Gerding und J.Lecomte: Rec.Trav.Chim. 69, 391 (1950)
- (68) R.K.Khanna, M.Korak und E.R.Lippincott: Spectrochim.Acta 22, 1759 (1966)

- (69) L.C.Thomas und R.A.Chittenden: Spectrochim.Acta 20, 467 (1964)
- (70) L.C.Thomas und R.A.Chittenden: Spectrochim.Acta 20, 489 (1964)
- (71) R.Suhrmann und F.Breyer: Z.physik.Chem.(Leipzig) B 23, 193 (1933)
- (72) E.Wicke, M.Eigen und Th.Ackermann: Z.physik.Chem.NF 1, 340 (1954)
- (73) Th.Ackermann: Z.phys.Chem.NF 27, 253 (1961)
- (74) Th.Ackermann: Z.phys.Chem.NF 41, 114 (1964)
- (75) G.Zundel und H.Metzger: Z.Naturf. 22a, 1412 (1967)
- (76) G.Zundel: "Hydration and Intermolecular Interaction", Academic Press New York 1969
- (77) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Physik 198, 288 (1967)
- (78) G.Zundel, H.Noller und G.M.Schwab: Z.Elektrochem. 66, 129 (1962)
- (79) G.Zundel und G.M.Schwab: J.physic.Chem. 67, 771 (1963)
- (80) Th.Ackermann, G.Zundel und K.Zwernemann: Z.physik.Chem.NF 49, 331 (1966)
- (81) G.Zundel und H.Metzger: Z.physik.Chem.NF 240, 50 (1969)
- (82) E.G.Weidemann und G.Zundel: Naturforschg. 25a, 627 (1970)
- (83) R.Janoschek, E.G.Weidemann, H.Pfeiffer und G.Zundel: J.Amer.chem.Soc. 94, 2387 (1972)
- (84) G.Zundel: Allgem.prakt.Chem.(Wien) 21, 329 (1970)
- (85) W.Seßler und G.Zundel: Z.physik.Chem.NF im Druck
- (86) W.Seßler: Dissertation Universität München 1971
- (87) E.Overton: Vjschr.naturf.Ges.Zürich 40, 159
- (88) E.Gorter und R.Grendel: J.exp.Med. 41, 439
- (89) J.F.Danielli und H.Davson: J.Cell.Comp.Physiol. 5, 495 (1935)
- (90) J.D.Robertson in: Symp.Biophys.Physiol.Biol.Transp., Springer, Wien 1967
- (91) J.D.Robertson in: Progr.Biophys. and Mol.Biol., Pergamon Press Oxford 1960
- (92) A.Benson: J.Amer.Oil Chem.Soc. 43, 265 (1966)

- (93) D.E.Green und A.Tzagoloff: J.Lipid Res. 7, 587 (1966)
- (94) E.D.Korn: Science 153, 1491 (1966)
- (95) F.S.Sjöstrand in: J.Järnefelt, Regulatory Functions of Biological Membranes. Elsevier Amsterdam 1968
- (96) F.S.Sjöstrand: J.Ultrastruc.Res. 9, 340 (1963)
- (97) R.Rendi und A.E.Vatter: Protoplasma 63, 202 (1967)
- (98) D.F.H.Wallach und A.Gordon: Fed.Proc. 27, 1263 (1968)
- (99) J.L.Kavanan: Fed.Proc. 25, 1096 (1966)
- (100) J.A.Lucy: J.theor.Biol. 7, 360 (1964)
- (101) W.Stoeckenius: J.Cell.Biol. 12, 221 (1962)
- (102) I.Tasaki: Nerve Excitation, C.C.Thomas, Publ.Springfield, Illinois/USA 1968
- (103) R.Blumenthal, J.P.Changeux und R.Lefever: Compt.Rendu Acad.Sci.Paris 270, 389 (1970)
- (104) J.Patrick, B.Valeur, L.Monnerie und J.P.Changeux: J.Membrane Biol. 5, 102 (1971)
- (105) T.L.Hill und Yi-der Chen: Proc.Nat.Acad.Sci.US 66, 607 (1970)
- (106) B.B.Hamel und I.Zimmermann: Biophys.J. 10, 1029 (1970)
- (107) D.Nachmansohn: Harvey Lect. 49, 57 (1953); Chemical and Molekular Basis of Nerve Activity, Academic Press New York 1959; Science 168, 1059 (1970)
- (108) M.K.Jain, R.H.L.Marks und E.H.Cordes: Proc.Nat.Acad.Sci. 61, 883 (1968); 67, 799 (1970)
- (109) I.Tasaki, A.Watanabe, R.Sandlin und L.Carnay: Proc.Nat. Acad.Sci.US 61, 883 (1968)
- (110) I.Tasaki, L.Carnay und R.Sandlin: Science 163, 683 (1969)
- (111) F.Conti und I.Tasaki: Science 169, 1322 (1970)
- (112) P.G.Shrager, A.Strickholm und R.I.Macey: J.Cell.Physiol. 74, 91 (1969)
- (113) H.R.Clark und A.Strickholm: Nature 234, 470 (1971)
- (114) J.C.Hsia, P.T.S.Wong und D.M.McLennan: Biochem.Biophys. Res.Comm. 43, 88 (1971)
- (115) D.F.H.Wallach und P.H.Zahler: Proc.Nat.Acad.Sci.US 56, 1552 (1966)
- (116) D.Chapman, V.B.Kamat und R.J.Levine: Science 160, 314 (1968)

- (117) D.H.Green und M.R.J.Salton: Biochim.Biophys.Acta 211, 139 (1970)
- (118) J.M.Graham und D.F.H.Wallach: Biochim.Biophys.Acta 241, 180 (1971)
- (119) T.Miyazawa und E.R.Blout: J.Amer.chem.Soc. 83, 712 (1961)
- (120) T.Miyazawa in: Poly- α -Amino Acids; C.D.Fasman Ed. Decker, New York 1967
- (121) H.Susi in: Struktüre and Stability of Biological Macromolecules; S.N.Timasheff und G.D.Fasman Eds. Decker New York 1969
- (122) Y.N.Chirgadze: Infrared Spectra and Struktüre of Polypeptides and Proteins; Akademia Nauk SSSR Moscow 1965
- (123) F.S.Parker: Infrared Spektroskopie, Adam Hilger London 1971

Lebenslauf

Am 18.7.1940 wurde ich als erstes Kind des damaligen städtischen Angestellten, Frixos Papakostidis und seiner Ehefrau Anna, geb. Stawridou in Athen geboren. Von 1946 bis 1952 besuchte ich dort die Volksschule und trat im Oktober 1952 in das naturwissenschaftliche Gymnasium ein.

Von Oktober 1954 bis Juli 1957 besuchte ich eine Berufsschule (Abendschule) für Maschinenbau. Im November 1957 bestand ich die gesetzliche Prüfung für Maschinenbauer beim griechischen Gewerbeministerium.

Im Juli 1958 legte ich die Reifeprüfung ab. Nach dem Abitur besuchte ich in Athen die höhere Lehranstalt für Elektronik (Abteilung Radiotechnik) und erhielt im Herbst 1959 das Diplom eines Radiotechnikers.

Im Oktober 1960 kam ich nach München, erlernte von Januar bis Juli 1961 die Deutsche Sprache und bestand anschließend eine Prüfung zur Feststellung der Hochschulreife für ausländische Studierende.

Im SS 1962 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München und legte im Februar 1965 das Vordiplom ab. Nach dem mündlichen Teil der Diplomchemiker-Hauptprüfung im Mai 1968 begann ich am Physikalisch-Chemischen Institut unter Leitung von Priv.-Doz.Dr.G.Zundel mit der Anfertigung der vorliegenden Diplom-Doktorarbeit.

